

**Zellautonome angeborene Immunantwort in
humanen Endothelzellen auf die Infektion mit
*Chlamydophila pneumoniae***

DISSERTATION
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie
eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin
von
Diplom Biologin Claudia van Laak

Präsident der Humboldt Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz
Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Stefan Hecht PhD

Gutachter:

- 1. Prof. Dr. T.F. Meyer**
- 2. Prof. Dr. R. Lucius**
- 3. Prof. Dr. B. Opitz**

Tag der mündlichen Prüfung: 10.04.2014

Für meinen Vater Hans-Joachim Buß

Danksagung

Beginnen möchte ich mit der Person, der meine Dissertation gewidmet ist, meinem Vater. Ohne seine grenzenlose und uneingeschränkte Unterstützung wäre ich nicht dort wo ich jetzt bin. Ich möchte ihm für die Ausdauer, Ruhe und Geduld danken, womit er mir stets zur Seite gestanden und mich immer wieder darin bestärkt hat, an meinen Zielen festzuhalten.

Der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie verdanke ich die glücklichste Fügung meines Lebens. Ohne ihre Existenz wäre mir der Mann, der meine innere Ausgeglichenheit und Stärke stets aufgebaut und gefestigt hat und mir auch in wissenschaftlichen Fragestellungen jederzeit hilfreich zu Seite stand, nie begegnet. Ich danke Dir Vincent für deine Toleranz, deine Engelsgeduld und deine Liebe die mich während der Zeit der Erstellung dieser Arbeit begleitet und getragen hat. Ich gewann durch Dich eine großartige Familie, die mir stets die nötige Sicherheit und Motivation vermittelt hat, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Uneingeschränktes Vertrauen in die liebevolle Betreuung meines Sohnes Theodor durch meine Schwiegereltern Gerhard und Cornelia van Laak ermöglichten es mir, meine volle Aufmerksamkeit dem Fortkommen dieser Arbeit zu widmen. Dafür danke ich Ihnen von Herzen.

Bereits während meiner Diplomarbeit habe ich von der stets motivierenden Betreuung meiner wissenschaftlichen Arbeit durch Dr. Julia Eitel profitiert. Umso mehr bedauerte ich ihren Weggang aus der Forschung um sich neuen beruflichen Zielen zu widmen. Ich danke ihr für ihre Unterstützung und vor allem für die Vermittlung des facettenreichen „know-hows“ in der Chlamydienforschung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Bastian Opitz für die Bereitstellung des Themas und die intensive Betreuung meiner Dissertation. Ohne sein enormes fachliches Wissen, seine Ideen aber auch seine Kritik, wäre mein Forschungsprojekt niemals soweit gekommen.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Meyer vom Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie in Berlin für das Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme des Erstgutachtens.

Prof. Dr. med. Norbert Suttrop danke ich, dass ich die vorliegende Arbeit in seinem Labor der Medizinischen Klinik für Infektiologie und Pneumologie der Charité, Universitätsmedizin Berlin durchführen durfte.

Ich danke der Jürgen Manchot Stiftung für die Bewilligung eines Doktorandenstipendiums, welches mir die Durchführung dieser Arbeit erst ermöglicht hat.

Der gesamten Arbeitsgruppe, besonders Bastian, Julia, Janina, Maya, Janine, Uwe, Juliane, Karolin, Steffi, Elena und Jan danke ich für die unglaublich nette Atmosphäre, den fachlichen Austausch, den Zusammenhalt, die Unterstützung im Labor und vor allem für den Spaß den wir zusammen hatten.

Ute Gläser danke ich für die technische Unterstützung, nicht zuletzt aber auch für unsere freundschaftliche Zusammenarbeit, und ganz besonders dafür, dass sie mir gezeigt hat wie wichtig es ist jeden Tag mit einem Lächeln zu begegnen. Frauke Schreiber, Doris Stoll, Janis Hantke, Jacqueline Hellwig und Annika Kühn danke ich ebenfalls für die technische Unterstützung, insbesondere bei der Zellkultur und Chlamydienanzucht.

Meiner lieben Jenny danke ich, dass sie die Zeit, die sie nicht hat, investiert hat um diese Arbeit zu lektorieren. Je l'en remercie de tout coeur.

Abschließend gilt mein herzlicher Dank auch meinem Großvater Rudolf Fischer, der die Fertigstellung dieser Arbeit leider nicht mehr miterleben kann, mir aber durch seine Geduld, insbesondere jedoch durch seine uneingeschränkte Unterstützung seit Beginn meines Studiums, diese Arbeit erst ermöglichte.

Abkürzungen

A. bidest	Aqua bidest illata, zweifach destilliertes Wasser
AP-1	aktivierendes Protein 1 (engl.: „ activating-protein-1 “)
APS	A mmonium p ersulfat
<i>C.p.</i>	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>
BSA	B ovines Seru a lalbumin
Cardif	IFN β -induzierender CARD-Adapter (engl.: “ CARD adaptor inducing IFN β ”)
chsp	chlamydiales H itzescho p rotein
cLPS	chlamydiales LPS
cLSM	Konfokale Laserscanmikroskopie (engl.: „ confocal laser scanning microscopy “)
DNA	engl.: „ D esoxyribo n uclein a cid“
DTT	D ithiothreitol
ECGM	Endothelzell-Wachstums-Medium (engl.: “ e ndothelial c ell g rowth m edium”)
EDTA	E thylendi a mintetra a zetat
ELISA	engl.: “ E nzyme- L inked I mmunosorbent A ssay”
ELK-1	engl.: „ETS domain-containing protein Elk-1 ”
FADD	Fas-assoziierte Todesdomäne (engl.: “ F as- a ssociated d eath d omain”)
FCS	Fötales Kälberserum (“ f etal c alf s erum“)
GM-CSF	engl.: “ g ranulocyte m acrophage c olony- s timulating f actor”
h	Stunde (engl.: “ h our”)
HCAP	engl.: “ h ealth- c are a cquired p neumonia”
HUVEC	Humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (engl.: “ h uman u mbilical v ein endothelial c ells”)
hIFN β	engl.: “ h uman i nterferon b eta”

mIFN β	engl.: “ m ouse i nterferon b eta”
Ig	I mmunglobulin
IKK	I κ B-assozierte Kinasen (engl.: “ I κ B -related k inases“)
IPC's	Interferon produzierende Zellen (engl.: “ i nterferone p roducing c ells“)
IPS-1	engl.: “ i nterferone- β - p romoter- s timulator- 1 ”
IRAK	IL-1-Rezeptor H assoziierte Kinase (engl.: “ I L-1- r eceptor H a ssociated k inase”)
IRF	I nterferon- r egulierender F aktor (engl.: “ i nterferone r egulatory f actor”)
ISGF	I nterferon stimulierter G enfaktor (engl.: “ I FN- s timulated g ene f actor”)
Jak-1	J anus- K inase- 1
JNK	c- J un N-terminal K inase
KH ₂ PO ₄	K alium h ydrogen p hosphat
kDa	K ilodalton
LPS	L ipopolysaccharid
LRR	Leucin reiche Wiederholungssequenz (engl.: “ l eucin r ich r epeats“)
MAVS	Mitochondriales antivirales Signalprotein (engl.: “ m itochondrial a ntiviral s ignaling p rotein“)
MCP-1	Monozyten Chemotaktisches Protein 1 (engl.: “ m onocyte c hemoattractant p rotein 1 “)
MDA-5	Melanoma Differenzierungs-assoziertes Gen 5 (engl.: “ m elanoma d ifferentiation- a ssociated g ene 5 “)
min.	M inuten
mKC	engl.: “ m urine k eratinocyte-derived c hemokine“
ml	M illiliter
MOI	Multiplikation der Infektion (engl.: “ m ultiplicity of i nfection“)

Nod	Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomäne (engl.: “ n ucleotid-binding- o ligomerization d omain“)
Myd-88	myeloider Differenzierungsfaktor 88 (engl.: “ m yeloid d ifferentiation factor 88 “)
NaCl	N atrium c hlorid
Na ₂ HPO ₄	N atrium h ydrogen p hosphat
NF-κB	Nukleärer Kernfaktor κB (engl.: “ n uclear factor κB “)
Omp	Äußerer Membrankomplex (engl.: “ o uter m embrane c omplex“)
PAMP	Pathogenassoziiertes molekulares Muster (engl.: “ p athogen- a ssociated m olecular p attern“)
PBS ⁻	Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Calcium und Magnesium
PBS ^{+/+}	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Calcium und Magnesium
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl.: “ p olymerase c hain r eaction“)
p.i.	nach Infektion (lat.: “post i nfectum“)
Pin-1	Mit der NIMA-Kinase interagierendes Protein 1 (engl.: “ p rotein i nteracting with n ever in m itosis A (NIMA) kinase 1“)
PMSF	P henyl m ethylsulfonyl f luorid
PFA	P araformaldehyd
PRR	Muster erkennender Rezeptor (engl.: “ p attern r ecognition r eceptor“)
R	R ezeptor
RICK	RIP-ähnliche, interagierende CLARP Kinase (engl.: “ R IP-Like-interacting C LARP k inase, auch RIP-2“)
RIG-I	Retinoidsäure induzierbares Gen1 (engl.: “ r etinoic acid i nducible g ene- I “)
RIP-1	Rezeptor H interagierendes Protein (engl.: “ r eceptor-H- i nteracting p rotein“)
rH	r ekombinantes h umanes
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: “ r ibonucleic acid“)

RT	R aum t emperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (engl.: “ r everse t ranscriptase p olymerase c hain r eaction“)
SDS	S odium d odecylsulfat
STAT	Signaltransduzierendes, aktivierendes Transkriptions-Protein (engl.: “ s ignal t ransducer and a ctivator of t ranscription“)
T	T emperatur
T75	Zellkulturflasche mit 75 cm ²
TAB	TAK-1 bindendes Protein (engl.: “ TAK -1 b inding protein“)
TAK	Transformierender Wachstumsfaktor b-aktivierte Kinase (engl.: transforming growth factor b- a ctivated k inase)
TBK-1	Tank-bindende Kinase 1 (engl.: tank- b inding- k inase 1)
TEMED	T etramethylethylendi a min
TIRAP	TIR-Domäne beinhaltendes Adapterprotein (engl.: “ T oll- i nterleukin 1 r eceptor (TIR) domain-containing a dapter p rotein“)
TIR	T oll/ I nterleukin-1 R ezeptor
TF	T ranskriptions f aktor
TRAF	TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor (engl.: “ TNF - r eceptor- a ssociated f actor“)
TRIF	IFN β -induzierendes TIR-Domänen beinhaltendes Adapterprotein (engl.: “ TIR -domain-containing adaptor protein- i nducing IFN β “)
Tyk-2	T yrosin- K inase-2
UE	U ntereinheit
% (v/v)	Volumenprozent: ml gelöste Substanz pro 100 ml Lösung
VISA	Virus induzierter Signaladapter (engl. : “ v irus i nduces s ignal a dapter“)
% (w/v)	Massenprozent, g gelöste Substanz pro 100ml

CAPNETZ Das Kompetenznetz “Ambulant Erworbener Pneumonien“ (engl.: “community acquired pneumonia“; CAP) ist eines der vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten Kompetenznetze in der Medizin.

Inhalt

Abkürzungen	3
1. Einleitung	12
1.1. Das angeborene Immunsystem.....	12
1.1.1. Mustererkennende Rezeptoren (PRRs)	13
1.1.1.1. Toll-like-Rezeptoren (TLRs)	14
1.1.1.2. NOD-like Rezeptoren (NLRs)	15
1.1.1.2.1. NLRX1	18
1.1.1.3. RIG-like-Rezeptoren (RLRs)	21
1.1.1.4. Zytosolische DNA-Rezeptoren.....	23
1.1.2. Reaktive Sauerstoffradikale (ROS)	24
1.1.3. Autophagie.....	26
1.1.4. Typ I-IFN.....	28
1.1.4.1. Interferon regulierende Faktoren (IRFs).....	29
1.1.4.2. Antibakterielle Funktionen von Typ I-IFN	31
1.2. <i>Chlamydomyphila pneumoniae</i>	33
1.2.1. Lebenszyklus	35
1.2.2. Virulenzfaktoren	38
1.2.3. Erkennung von <i>C. pneumoniae</i> durch das angeborenen Immunsystem	39
1.3. Zielstellung der Arbeit.....	42
2. Ergebnisse	43
2.1. Lebende <i>C. pneumoniae</i> induzieren IFN β in primären humanen Endothelzellen	43
2.2. Die <i>C. pneumoniae</i> -vermittelte IFN β -Produktion ist IRF3-abhängig.....	44
2.3. Die <i>C. pneumoniae</i> -vermittelte IFN β -Produktion ist IRF7-abhängig.....	47
2.4. Das Signalprotein MAVS beeinflusst die IRF3/7-abhängige IFN β -Produktion	49
2.5. Der MAVS-IRF3/7-Typ I-IFN-Signalweg beeinflusst die Vermehrung von <i>C. pneumoniae</i> in HUVEC	52
2.6. Einfluss von NLRX1 auf die Vermehrung von <i>C. pneumoniae</i> in humanen Endothelzellen	54
2.7. NLRX1 hat keinen Einfluss auf die Produktion von Typ I-IFN und proinflammatorischen Zytokinen in <i>C. pneumoniae</i> infizierten Zellen ..	57
2.8. <i>C. pneumoniae</i> induziert die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale unabhängig vom Mitochondrium	59
2.9. Einfluss des Inflammasom-Adpatermoleküls ASC auf die Vermehrung von <i>C. pneumoniae</i>	63

2.10. Einfluss der Autophagie auf die Replikation von <i>C. pneumoniae</i>	65
3. Diskussion.....	67
3.1. Aktivierung des MAVS-IRF-IFN β -Signalweges durch <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	68
3.2. Beteiligung intrazellulärer Rezeptoren an der MAVS-IRF-vermittelten IFN β -Induktion.....	69
3.3. Die MAVS-IRF-IFN β -vermittelte intrazelluläre Abwehr gegen <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> im Endothel	72
3.4. NLRX1 hemmt die <i>C. pneumoniae</i> -Infektion in Endothelzellen und Makrophagen.....	75
3.5. Mechanismus der NLRX1-vermittelten zellautonomen Resistenz gegenüber einer Infektion mit <i>C. pneumoniae</i>	77
3.5.1. Beteiligung von Typ I-IFN	77
3.5.2. Regulation von proinflammatorischen Zytokinen (IL-6, IL-1 β und KC) durch NLRX1	77
3.5.3. Bedeutung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) für die NLRX1-vermittelte zellautonome Abwehr gegen <i>C. pneumoniae</i>	78
3.5.4. Beteiligung der Inflammasome an der NLRX1-abhängigen Hemmung von <i>C. pneumoniae</i>	79
3.5.5. Beteiligung von Autophagie an der NLRX1-abhängigen Hemmung von <i>C. pneumoniae</i>	80
3.5.6. Zelltoxizität von NLRX1	81
3.5.7. Induktion NLRX1-abhängiger Resistenzmechanismen durch chlamydiale Faktoren	81
4. Zusammenfassung und Ausblick	83
5. Summary	85
6. Material	86
6.1. Geräte.....	86
6.2. Zubehör.....	87
6.3. Puffer und Lösungen	88
6.4. Chemikalien.....	92
6.5. Enzyme	94
6.6. Kommerzielle Systeme.....	94
6.7. Oligonukleotide	95
6.8. Antikörper.....	98
6.9. Bakterienstämme	100
6.10. Zellen und Zellmedien.....	100

7. Methoden	103
7.1. Kultivierung von Zellen	103
7.1.1. Gewinnung von human umbilical cord vein endothelial cells (HUVEC)	103
7.1.2. Kultivierung der HUVEC	103
7.1.3. Kultivierung von HEp-2-Zellen (humane Epithelzellen)	104
7.1.4. Gewinnung von murinem Knochenmarksmakrophagen	104
7.1.5. Kultivierung muriner Knochenmarksmakrophagen	105
7.2. Bakterienkultur	105
7.2.1. Chlamydien-Anzucht	105
7.2.2. Chlamydien-Aufreinigung	105
7.2.3. Chlamydien-Anfärbung mittels eines FITC-markierten Antikörpers	105
7.2.4. Chlamydien-Anfärbung mittels eines nicht markierten Antikörpers	106
7.2.5. Stimulation von HUVEC-Zellen mit <i>C. pneumoniae</i>	106
7.2.6. Chlamydien-Inaktivierung	107
7.2.7. Reinfektionsexperimente in HEp-2-Zellen	107
7.3. Molekularbiologische Arbeitsmethoden	107
7.3.1. RNA-Isolation (RNeasy®, Qiagen; PerfectPure RNA Tissue Kit, 5'prime)	107
7.3.2. RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion)	108
7.3.3. Semiquantitative RT-PCR	108
7.3.4. Agarose-Gelelektrophorese und Gel-Dokumentation der semiquantitativen RT-PCR	109
7.3.5. Quantitative PCR (Polymerase-Kettenreaktion)	109
Quantitative PCR (TaqMan®)	109
Quantitative PCR (SYBR® Green PCR)	111
7.3.6. Transfektion (Nukleofektion mittels Amaxa Nucleofector™)	111
7.3.7. Transfektion (Lipofektion mittels HiPerFect® Transfektionsreagenz)	112
7.4. Proteinbiochemische Methoden	112
7.4.1. Proteinextraktion und Proteinbestimmung	112
7.4.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	112
7.4.3. Immunoblot	113
7.4.4. Vorbehandlung von HUVECS mit humanem rekombinantem IFNβ	113
7.4.5. IFNβ ELISA	114

7.4.6.	Konfokalmikroskopie	114
7.4.7.	Messung intrazellulärer Sauerstoffradikale	115
8.	Literaturverzeichnis	116
9.	Appendix	149
9.1.	Curriculum vitae	149
9.2.	Kongressbeiträge	149
9.3.	Publikationen	150
9.4.	Selbstständigkeitserklärung	151

1. Einleitung

1.1. Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem bildet die erste Abwehrstufe gegen invadierende Pathogene, wie Bakterien oder Viren. Darüber hinaus dient es auch zur Aktivierung und Regulation der adaptiven Immunantwort, welche antigenspezifisch reagiert und in eine zelluläre und humorale Immunantwort unterteilt werden kann. An der angeborenen Immunantwort sind eine Vielzahl von Zelltypen und löslichen Faktoren beteiligt, die alle zusammen ein höchst effektives Abwehrsystem bilden. Zu den klassischen Komponenten des angeborenen Immunsystems gehören das Komplementsystem (Serumkomponenten), Natürliche Killerzellen, lokale Abwehrzellen wie Makrophagen, dendritische Zellen und Neutrophile Granulozyten sowie Zytokine als lösliche Botenstoffe. Das angeborene Immunsystem erkennt ein breites Erregerspektrum ohne vorherige Exposition. Im Wesentlichen sind hierfür Makrophagen, dendritische Zellen sowie weitere Immunzellen aber auch Epithel und Endothelzellen verantwortlich (Kawai und Akira, 2010; Takeuchi und Akira, 2010; Medzhitov, 2007). Die Aktivierung der adaptiven Immunantwort ist hauptsächlich abhängig von den dendritischen Zellen, die durch ihre spezifische Antigenpräsentation eine Aktivierung von T-Zellen und somit die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses ermöglichen. Das angeborene Immunsystem erkennt mikrobielle Moleküle durch ein sogenanntes Muster-Erkennungs-System (engl.: „pattern recognition system“) (Janeway und Medzhitov, 2002). Die Anwesenheit von mikrobiellen Komponenten, wie z. B. Zellwandbestandteilen oder Nukleinsäuren nach einer Infektion mit Pilzen, Bakterien und Viren stimuliert die angeborene Immunantwort über verschiedene mustererkennende Rezeptoren (engl.: „pattern recognition receptors“, PRRs). Zu den am besten untersuchten PRRs zählen die Toll-like Rezeptoren (TLRs) und die Nod-like Rezeptoren (NLRs) aber auch RNA-Helikasen wie RIG-I und MDA5, welche die Regulation und Produktion von inflammatorischen und antimikrobiellen Faktoren vermitteln (Honda und Taniguchi, 2006). Ihre Liganden können in folgende zwei Gruppen unterteilt werden.

Bei den PAMPs (engl.: „pathogen-associated molecular pattern“) handelt es sich um hochkonservierte Moleküle, welche von einer großen Gruppe Mikroorganismen exprimiert werden. Darunter befinden sich Zymosane, Lipoproteine, Glykolipide, LPS, Flagellin, Peptidoglykan sowie Nukleinsäuren verschiedenen Ursprungs (Kumar et al., 2011).

Zu den DAMPs (engl.: „damage-associated molecular patterns“) hingegen zählen endogene Moleküle, die normalerweise intrazellulär in den Wirtszellen exprimiert werden und somit dem Immunsystem verborgen bleiben. Bei Zell-, bzw. Gewebeschädigung können diese Moleküle jedoch freigesetzt werden und nachfolgend eine inflammatorische Immunantwort auslösen. Zu den DAMPs gehören z. B. HMGB-1-Proteine (engl.: „high mobility group box 1 protein“), Akutphaseproteine (z. B. Serumamyloid A), Harnsäure, Matrixproteine, S100-Proteine, aber auch Nucleotide wie ATP (Seong und Matzinger, 2004; Rock et al., 2008; van Eden et al., 2012).

1.1.1. Mustererkennende Rezeptoren (PRRs)

Die für die Aktivierung der angeborenen Immunantwort verantwortlichen PRRs lassen sich bezüglich ihrer Lokalisation in drei verschiedene Gruppen unterteilen (Takeuchi und Akira, 2010).

1. Sekretierte PRRs, wie z. B. das Mannose-bindende Lektin, das für die Opsonierung im Rahmen der Komplementaktivierung verantwortlich ist.
2. Membrangebundene Rezeptoren wie z. B. die Toll-like Rezeptoren (TLRs), die zum Teil auch in der endosomalen Membran lokalisiert sein können (Beutler, 2009).
3. Intrazelluläre PRRs, wie z. B. die RIG-like- oder Nod-like Rezeptoren, aber auch intrazelluläre Nukleinsäurerezeptoren wie z. B. AIM2 (engl.: „absent in melanoma 2“), ZBP1 (engl.: „Z-DNA-binding protein 1“) und die RNA-Polymerase III („POL III“) (Ablasser et al., 2009).

Die Aktivierung dieser Rezeptoren führt zur Induktion verschiedenster Signalwege. Hierbei kommt es unter anderem zur Aktivierung einer NF- κ B- und MAPK-Kinasen/AP-1-abhängigen Genexpression proinflammatorischer Zytokine, zur Caspase-1-vermittelten posttranslationalen Regulation von Zytokinen aus der IL-1-Familie sowie dem Caspase-1-abhängigen proinflammatorischen Zelltod (Pyroptose) (Miao et al., 2010). Auch eine IRF-vermittelte Induktion von Typ I-IFN, wie z. B. IFN β , kann durch die Aktivierung einiger PRRs ausgelöst werden (Taniguchi et al., 2006).

Als Auslöser dieser und vieler weiterer komplexer Signalkaskaden sind die PRRs maßgeblich an der Regulation zellulärer Prozesse im Rahmen der angeborenen aber auch der erworbenen Immunabwehr beteiligt.

1.1.1.1. Toll-like-Rezeptoren (TLRs)

Bei den Toll-like-Rezeptoren handelt es sich um die bislang am besten untersuchte Klasse der PRRs. Bisher wurden in Säugetieren 13 verschiedene TLRs charakterisiert. Die TLRs TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6 befinden sich auf der Zelloberfläche und erkennen unter anderem LPS, bakterielle Lipoproteine, Zymosan und Flagellin; wohingegen TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 intrazellulär in Endosomen lokalisiert sind und an der Erkennung von Nukleinsäuren beteiligt sind (Alexopoulou et al., 2001; Hemmi et al., 2000; Hoshino et al., 1999; Poltorak et al., 1998; Qureshi et al., 1999; Medzhitov et al., 2006). Bei den TLRs handelt es sich um transmembrane Glykoproteine (vom Typ-I), die eine zytosolische Toll/IL-1R(TIR)-Domäne aufweisen (Dunne et al., 2003). Eine Ligandenbindung der TLRs führt zunächst zu deren Dimerisierung. Eine damit verbundene Konformationsänderung ermöglicht die Rekrutierung sogenannter TIR-Domänen-enthaltender Adapter-Moleküle (engl.: „TIR-domain-containing adaptor molecules“). Bislang sind fünf entsprechende Adaptermoleküle charakterisiert worden. MyD88 (engl.: „myeloid-differentiation-factor-88“) spielt als Adaptermolekül eine zentrale Rolle in der Signalweiterleitung nach der Aktivierung der meisten TLRs und Rezeptoren der IL-1-Rezeptor-Familie. Nach der Interaktion der beiden Moleküle mittels der TIR-Domäne, kommt es zur Rekrutierung und Phosphorylierung von IRAK-1 und IRAK-4 (Adachi et al., 1998; Burns et al., 1998; Kawai et al., 1999; Li et al., 2002; Medzhitov et al., 1998; Suzuki et al., 2002; Swantek et al., 2000; Wesche et al., 1997). Die Aktivierung dieser Kinasen induziert die Bindung von TRAF6 und vermittelt die Expression NF- κ B-abhängiger proinflammatorischer Zytokine, wie z. B. TNF- α , IL-1 und IL-6. Eine Ausnahme bezüglich der Verwendung von MyD88 stellt TLR3 dar. TLR3 interagiert mit einem anderen Adaptermolekül, dem sogenannten TRIF (IFN β -induzierendes-TIR-Domänen-beinhaltendes Adapterprotein, (engl.: „TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFN β “) (Yamamoto et al., 2003). Sowohl TLR4 als auch die endosomalen TLRs sind ebenfalls dazu in der Lage, Typ I-Interferone zu induzieren. Hierbei aktivieren TLR7 und TLR9 die Typ I-IFN-Antwort mittels MyD88 und IRF7. TLR3 und TLR4 hingegen induzieren mittels TRIF (und im Falle von TLR4 auch TRAM) eine IRF3-abhängige Typ I-IFN-Antwort (Hoebe, 2003; Kawai et al., 2001; Yamamoto et al., 2003).

1.1.1.2. NOD-like Rezeptoren (NLRs)

Bei der Familie der NLRs (engl.: „nucleotide-binding-oligomerization-domain-like receptors“) handelt es sich um intrazelluläre Rezeptormoleküle, welche sowohl durch eine zentrale Nukleotid-bindende- (engl.: „nucleotide binding domain“, NBD) als auch durch eine C-terminale Leucin-reiche-Wiederholungssequenz-Domäne charakterisiert sind (engl.: „leucin-rich-repeats“, LRR) charakterisiert sind (Fritz et al., 2006). Die NBD ist in der Lage, Nukleotide zu binden und mittels Konformationsänderungen und mit Hilfe von Selbst-Oligomerisations-Prozessen die Funktion des NLR aufrecht zu erhalten. Anhand der N-terminalen Effektor-domäne, lassen sich die NLRs in verschiedene Unterfamilien einteilen (Tab.1). Bei diesen Effektor-domänen, handelt es sich in den meisten Fällen, entweder um eine CARD- (engl.: „caspase-activation and recruitment-domain“-) Domäne, eine PYD- (engl.: „pyrin domain“-) Domäne oder eine BIR- (engl.: „Baculovirus IAP Repeat“) Domäne (Tab. 1). Diese Effektor-domänen sind an Protein-Interaktionen beteiligt und vermitteln die Rekrutierung weiterer Effektor-moleküle (Ting et al., 2008). Die Abbildung 1 zeigt ein 3D-Strukturmodell der NLR-Aktivierung.

NLR- Unterfamilie	Bezeichnung (<i>Homo sapiens</i>)	N- Terminus	Synonyme
NLRA			
	CIITA	CARD	NLRA/MHCIITA/C2TA
NLRB			
	NAIP	BIR	BIRC1/CLR5.1
NLRC			
	NOD1	CARD	NLRC1/CARD4/CLR7.1
	NOD2	CARD	NLRC2/CARD15/CD/BLAU/IBD1/PSORAS1/CLR16.3
	NLRC3	CARD	NOD3/CLR16.2
	NLRC4	CARD	IPAF/CARD12/CLAN/CLR2.1
	NLRC5	CARD	NOD27/NOD4/CLR16.1
NLRP			
	NLRP1	PYD	NALP1/CARD7/NAC/DEFCAP/CLR17.1
	NLRP2	PYD	NALP2/PYPAF2/NBS1/PAN1/CLR19.9
	NLRP3	PYD	NALP3/Cryopyrin/CIAS/PYPAF1/CLR1.1
	NLRP4	PYD	NALP4/PYPAF4/PAN2/RNH2/CLR19.5
	NLRP5	PYD	NALP5/PYPAF8/MATER/PAN11/ CLR19.8
	NLRP6	PYD	NALP6/PYPAF5/PAN3/CLR11.4
	NLRP7	PYD	NALP7/PYPAF3/NOD12/PAN7/CLR19.4
	NLRP8	PYD	NALP8/PAN4/NOD16/CLR19.2
	NLRP9	PYD	NALP9/NOD6/PAN12/CLR19.1
	NLRP10	PYD	NALP10/PAN5/NOD8/PYNOD/CLR11.1
	NLRP11	PYD	NALP11/PYPAF6/NOD17/PAN10/CLR19.6
	NLRP12	PYD	NALP12/PYPAF7/Monarch1/RNOS/PAN6/CLR19.3
	NLRP13	PYD	NALP13/NOD14/PAN13/CLR19.7
	NLRP14	PYD	NALP14/ PAN8/NOD5/CLR11.2
NLRX1			
	NLRX1	MT	NOD5/NOD9/CLR11.3

Tab. 1: Gliederung der Unterfamilien der NOD-like Rezeptoren. Diese Tabelle wurde nach Elinav et. al, 2011 erstellt.

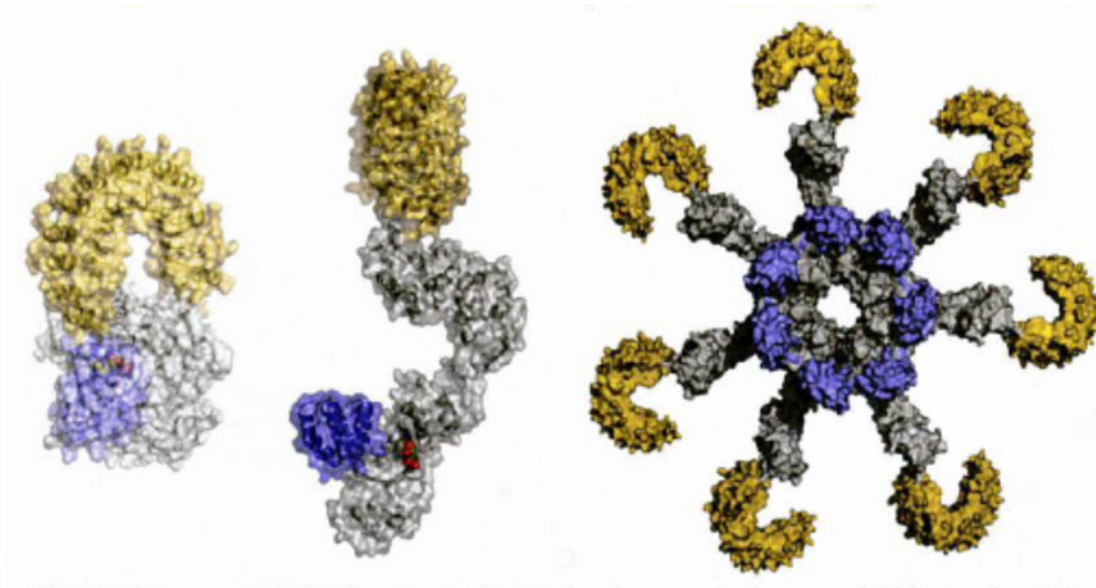


Abb. 1: NLR-Aktivierung: Mit Hilfe der LRR-Domäne (gelb) wird der Rezeptor in einem autoinhibierten Zustand gehalten. Nach Ligandenbindung kommt es zu einer Konformationsänderung. Die Effektordomäne (in blau dargestellt) kann nun mit weiteren Signalmolekülen interagieren (Abbildung aus Schwarzenbacher und Pröll, 2008).

Bei den fünf verschiedenen Unterfamilien der NLRs handelt es sich um die Familien NLRA (dessen Mitglieder eine Card-Domäne beinhalten), NLRB (die eine BIR (engl.: „baculovirus inhibitor of apoptosis repeat“-)Domäne aufweisen), NLRC (die durch eine CARD-Domäne charakterisiert sind) und NLRP (die eine PYD-Domäne besitzen) (Tab.1). Mitochondrial lokalisiert ist das NLRX1-Protein, welches eine N-terminale, mitochondriale Zieldomäne (engl.: „mitochondrial target sequence“, MT) aufweist (Arnoult et al., 2009) (Tab. 1). Bei den bisher am besten charakterisierten NLRs handelt es sich um NOD1 (NLRC1) und NOD2 (NLRC2), welche verschiedene strukturelle Motive des Peptidoglykans der bakteriellen Zellwand im Wirtszytosol erkennen. Das NOD1-Protein bindet hauptsächlich meso-Diaminopimelinsäure enthaltende Peptidoglykanbestandteile, die überwiegend in gram-negativen Bakterien vorkommen. NOD2-initiierte Signalwege hingegen, werden durch die Stimulation mit einer, bei nahezu allen Bakterien vorhandenen, Peptidoglykanstruktur aktiviert, dem Muramyl-dipeptid (MurNAC-L-Ala-D-isoGln, MDP) (Inohara et al., 2003; Werts et al., 2007; Girardin, et al., 2003*). Sowohl NOD1 als auch NOD2 aktivieren NF- κ B (Inohara et al., 1999, Akira et al., 2004). An diesem Signalweg sind über eine CARD-Domänen-Interaktion die Proteinkinase RICK (RIP-like-interacting CLARP-Kinase, auch RIP-2) sowie die Signalmoleküle TAK1 und der IKK-Komplex beteiligt (Inohara et al., 2000; Ogura et al., 2001). NOD1 und NOD2 können

zudem die MAP-Kinasen JNK (Girardin et al., 2001) und p38 (Opitz et al., 2006) aktivieren, welche nachfolgend die Transkription inflammatorischer Gene regulieren.

Innerhalb der NLRP-Unterfamilie handelt es sich um NLRP3, das am besten charakterisierte Protein. NLRP3 sowie weitere NLRP-Proteine sind in der Lage, einen Caspase-1 aktivierenden Multiproteinkomplex zu bilden, welcher allgemein als Inflammasom bezeichnet wird und durch eine Vielzahl von mikrobiellen, nicht-mikrobiellen und endogenen Stimuli aktiviert werden kann. NLRP3 wird durch verschiedenste Bakterien (u. a. Staphylokokken, Listerien oder Neisserien), Viren (u. a. EMCV, Sendai- und Influenza-Viren) und Pilze (u.a. *Candida* und *Saccharomyces*) aktiviert (Gross et al., 2009). Auch nicht-infektiöse Moleküle sind in der Lage, das Inflammasom zu aktivieren (Seong und Matzinger, 2004; Schroder et al., 2010). Beispiele hierfür sind sowohl Moleküle wie Amyloid- β , ATP, Hyaluronan und Imidazochinolin als auch Kristall-bildende Substanzen wie Aluminiumhydroxid, Asbest, Cholesterin, Harnsäure und Siliziumdioxid (Cassel et al., 2008; Duewell et al., 2010; Martinon et al., 2006; Dostert et al., 2008; Halle et al., 2008; Hornung et al., 2008; Yamasaki et al., 2009; Zhaou et al., 2010; Eisenbarth et al., 2008). Für die Bildung der meisten NLRP3-Inflammasome ist das Adaptermolekül ASC (engl.: „apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD“) von essentieller Bedeutung (Agostini et al., 2004). ASC bindet in vielen Inflammasomen über dessen PYD-Domäne an PYD-exprimierende NLR-Proteine und vermittelt über die außerdem enthaltene CARD-Domäne die Autoproteolyse der Pro-Caspase-1. Es entsteht die katalytisch aktive Caspase-1 und im folgenden Prozess wird u.a. pro-IL-1 β und pro IL-18 in deren biologisch aktiven Formen überführt (Agostini et al., 2004).

1.1.1.2.1. NLRX1

Lokalisation

NLRX1 (engl.: „nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat containing X1“) ist ein kürzlich beschriebenes NLR-Familienmitglied, das in der äußeren mitochondrialen Membran, und/oder in der mitochondrialen Matrix lokalisiert zu sein scheint (Arnoult et al., 2009; Xiao et al., 2012). Für diese mitochondriale Lokalisation ist die N-terminale MT-Sequenz von NLRX1 essentiell.

Struktur

Mit Hilfe von Kristallstrukturanalysen konnte das C-terminale NLRX1-Fragment (cNLRX1) näher charakterisiert werden (Hong et al., 2012). cNLRX1 umfasst drei verschiedene Domänen: eine N-terminale α -helikale Domäne (LRRNT), ein zentrales NACHT-Modul (LRRM) und einen C-terminalen Verbund aus drei α -Helices (LRRCT). Komplexe Interaktionsprozesse innerhalb von cNLRX1 führen zur Trimerisierung dreier Dimere und schließlich zur Ausbildung einer hexameren Struktur. Eine Interaktion von LRRNT mit LRRM führt zu einer Stabilisierung der LRR-Faltung und ist gleichzeitig an der Oligomerisierung von NLRX1 beteiligt. LRRCT hingegen weist eine besondere α -helikale Struktur auf, die an der Dimerisierung von cNLRX1 mittels symmetrischer LRRCT-Interaktionen beteiligt ist. Diese Interaktion ähnelt zwar den Interaktionen der Effektordomänen anderer NOD-like Rezeptoren. (Hong et al., 2012) jedoch unterscheidet sich die Domänen-Architektur von NLRX1 von der anderer Mitglieder der NLR-Familie.

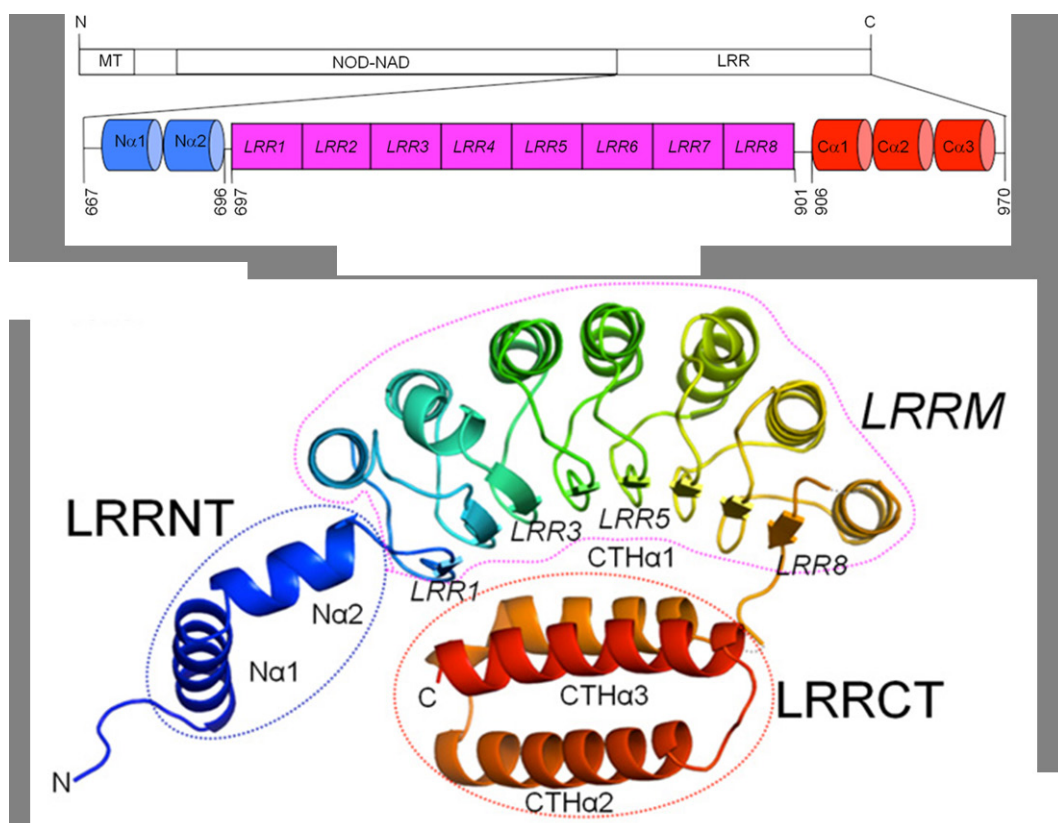


Abb. 2: Gesamtstruktur von NLRX1. oben: Schematische Abbildung von NLRX1 (MT-NOD-NAD-LRR) und dem c-terminalen Fragment von NLRX1; unten: ein cNLRX1- Monomer (aus Hong et al., 2011).

Zudem konnten Hong et al. im Rahmen struktureller Untersuchungen des C-terminalen NLRX1-Fragmentes auch eine physikalische Interaktion des aufgereinigten cNLRX1 mit poly I:C als auch mit Einzel- und Doppelstrang-RNA nachweisen (Hong et al., 2012). Hierbei scheint die Aminosäure Arg699 eine zentrale Rolle einzunehmen. Darüber hinaus konnte Arg699 mit Hilfe von Punktmutationsanalysen auch als entscheidender Faktor in der Induktion von ROS nach Stimulation mit poly I:C identifiziert werden. (Hong et al., 2012).

Funktion/Signaltransduktion

Eine mögliche Inhibition des antiviralen RIG-I-like-Rezeptor-Signalweges durch NLRX1 wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Allen et al., 2011; Rebsamen et al., 2011). Eine Studie konnte zeigen, dass NLRX1-defiziente Knochenmarksmakrophagen (BMM; engl.: „bone marrow-derived macrophages“) nach viraler Infektion weniger Typ I-IFN produzierten als Wildtyp-Makrophagen (Allen et al., 2011). Studien zweier anderer Arbeitsgruppen zeigten unter Verwendung von NLRX1-defizienten BMMs und Fibroblasten (MEF; engl.: „mouse embryonic fibroblasts“) jedoch keinerlei Einfluss auf die Induktion von IFN β und IL-6 nach viraler Infektion oder Stimulation mit dsRNA (Rebsamen et al., 2011; Soares et al., 2012). Untersuchungen ergaben außerdem, dass NLRX1 auch TLR-vermittelte Signalwege reguliert die NF- κ B aktivieren (Xia et al., 2011; Allen et al., 2011).

Im Jahre 2008 wurde zudem eine Arbeit mit Hinweisen auf eine Funktion von NLRX1 in der Regulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, engl.: “reactive oxygen species”) publiziert (Tattoli et al., 2008). In dieser Arbeit wurde u.a. gezeigt, dass die ektope Expression von NLRX1 die ROS-Produktion nach Stimulation mit TNF- α oder einer Infektion mit *Shigella flexneri* verstärkt (Tattoli et al., 2008). Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Interaktion von NLRX1 mit dem Mitochondrium bei der Induktion von ROS eine essentielle Rolle zu spielen scheint (Tattoli et al., 2008).

Mit Hilfe von SILAC-Analysen (engl.: „stable isotope labeling by amino acids in cell culture“), einer Methode zur quantitativen Proteomanalyse, konnten Lei et al. erst kürzlich einen weiteren möglichen direkten Interaktionspartner von NLRX1 identifizieren (Lei et al., 2012). Dabei handelt es sich um den mitochondrialen Tu-Translations-Elongationsfaktor TUFM. Ko-Immunopräzipitationsexperimente konnten eine spezifische Interaktion von NLRX1 mit dem Elongationsfaktor TUFM bestätigen. Ähnlich wie NLRX1 scheint auch TUFM einen inhibitorischen Effekt auf den RLR-Signalweg auszuüben (Lei et al., 2012). In dieser Studie

konnte auch der Zusammenhang von NLRX1 mit einem weiteren Abwehrmechanismus hergestellt werden, der Autophagie. Die Autophagie ist ein zellulärer Prozess zum Abbau und zum Recycling von Zellbestandteilen. Darüber hinaus hat die Autophagie eine wichtige Funktion in der zellautonomen Abwehr gegen Viren sowie intrazellulären Bakterien und Parasiten (siehe auch Kapitel das 1.1.3. zur Autophagie). Nach Lei et al. sind sowohl NLRX1 als auch der Elongationsfaktor TUFM essentiell an der virus-induzierten Autophagie in humanen Zellen beteiligt (Lei et al., 2012; Kapitel 1.1.3. zur Autophagie).

Bindungspartner

Zwei Studien konnten einen potentiellen Bindungspartner von NLRX1 in der mitochondrialen Matrix identifizieren. Hierbei handelt es sich um das Protein UQCRC2 des Atmungsketten-Komplex-III (Arnoult et al., 2009; Rebsamen et al., 2011). Diese Interaktion stellt eine mögliche Basis für die Induktion reaktiver Sauerstoffradikale dar (Rebsamen et al., 2011).

Einige der bisherigen Untersuchungen weisen außerdem darauf hin, dass NLRX1 im unstimulierten Status einen inhibitorischen Komplex mit dem Adaptermolekül MAVS bildet (engl.: „mitochondrial antiviral signaling protein“) (Allen et al., 2011; Moore et al., 2008). Es wird vermutet, dass eine Bindung von RNA an NLRX1 eine Konformationsänderung von NLRX1 und/oder eine Veränderung des Oligomerisationsstatus des Moleküls bewirkt, welche wiederum zu einer Ablösung vom Adaptermolekül MAVS führen könnte (Hong et al., 2012).

1.1.1.3. RIG-like-Rezeptoren (RLRs)

Die Familie der RIG-I-like-Rezeptoren (RLRs) besteht aus den intrazellulären Proteinen RIG-I (engl.: „retinoic acid-inducible gene I“), MDA5 (engl.: „melanoma differentiation associated factor 5“) und LGP2 (engl.: „Laboratory of Genetics and Physiology 2“) (Loo und Gale, 2011), wobei letzterem eher eine regulatorische Aufgabe im RLR/MDA5-Signalweg zuzukommen scheint (Saito et al., 2007). RIG-I und MDA5 sind an der Erkennung einer Vielzahl von RNA-Viren beteiligt (Loo und Gale, 2011). Die Erkennung von viraler oder synthetischer RNA führt hierbei zu einer Produktion von Typ I-IFN (Yoneyama et al., 2004). RIG-I bindet und erkennt sowohl einzelsträngige RNA-Sequenzen mit einem Triphosphat am 5'-Ende (Hornung et al., 2006) als auch kurze doppelsträngige RNA mit 21 bis 27 Nukleotiden Länge (Pichlmair et al.,

2006; Kato et al., 2008). MDA5 hingegen ist für die Erkennung längerer dsRNA-Fragmente (>2 kb) wie poly I:C verantwortlich (Kato et al., 2006; Kato et al., 2008).

Humanes RIG-I besteht aus zwei N-terminalen CARD-Domänen und einer C-terminalen Domäne, welche durch eine ATP-abhängige RNA-Helikasen-Aktivität gekennzeichnet ist. RIG-I aktiviert nach Virusstimulation NF- κ B, IRF3 und IRF7 über diese N-terminale CARD-Region (Yoneyama et al., 2004). Sowohl aktiviertes RIG-I als auch aktiviertes MDA-5 interagieren mit Hilfe ihrer CARD-Domänen mit dem Adaptermolekül MAVS (engl.: „mitochondrial antiviral signaling protein“), das in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist (Xu et al., 2005). MAVS ist unter anderem an der Aktivierung der Serin/Threonin-Kinasen TBK1 (engl.: „tank-binding-kinase 1“) und IKK-i (IKK ϵ) (engl.: „I κ B-related kinase“) mittels des Signalmoleküls TRAF3 (engl.: „tumor necrosis factor(TNF) receptor-associated factor 3“) beteiligt (Fitzgerald et al., 2003; Hemmi et al., 2004; Häcker et al., 2006). Diese Kinasen phosphorylieren die Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 was zu deren Translokation vom Zytoplasma in den Zellkern und schließlich zur Induktion von Typ I-IFN und IFN-induzierbaren Genen führt (Sato et al., 2000; Honda et al., 2005). Zusätzlich induziert aktiviertes MAVS mit Hilfe des FADD- und Caspase-8/-10-Signalwegs NF- κ B (Takahashi et al., 2006).

Eine Vielzahl von weiteren Regulatoren des RLR-Signalweges sind bisher bekannt. Eine Negativregulation von RIG-I erfolgt unter anderem nach Modifikation durch die E3-Ubiquitin-Ligase (Gack et al., 2007). Das proteosomale Protein PSMA7 bindet direkt an das Adaptermolekül MAVS und inhibiert dessen Aktivität (Jia et al., 2008). Zwei weitere Studien zeigen eine Beteiligung zweier Mitglieder der Caspase-Familie. So haben sowohl die Caspase 8 als auch die Caspase 12 einen negativen Einfluss auf die RLR-Aktivität (Takashashi et al., 2006 und Wang et al., 2010). Auch der an der Autophagie beteiligte Proteinkomplex ATG5-ATG12 scheint an einer Inhibition der RIG-I-MAVS-Interaktion beteiligt zu sein (Jounai et al., 2007).

Erst kürzlich konnten erstmals auch Wechselbeziehungen zwischen den RLR- und den NLR-Signalwegen aufgezeigt werden. Sabbah et al. konnten eine Bindung viraler Einzelstrang-RNA an NOD2 und eine direkte Wechselwirkung von NOD2 mit dem Adaptermolekül MAVS nachweisen, was im Anschluss zu einer IRF3-vermittelten IFN-Induktion führt (Sabbah et al., 2009). Diese Studie führt zu einem Modell zweier Aktivierungsmechanismen von NOD2, nach welchen die bakterielle Aktivierung von NOD2 zu einer RIP2-abhängigen Aktivierung von NF-

κ B führt. Die virale Stimulation löst hingegen eine NOD2/MAVS-vermittelte Induktion von IRF3 aus und bewirkt schließlich die Produktion von Interferon (Sabbah et al., 2009).

1.1.1.4. Zytosolische DNA-Rezeptoren

Das Vorhandensein von DNA im Zytosol von Wirtszellen, z. B. durch Infektion mit DNA-Viren oder Bakterien, stimuliert eine Produktion von Typ I-IFN, NF- κ B-abhängigen proinflammatorischen Mediatoren (Stetson und Medzhitov, 2006) und kann durch eine Caspase-1-Aktivierung das AIM2-Inflammasom stimulieren (siehe unten). Takaoka et al. identifizierten 2007 den zytosolischen DNA-Rezeptor DAI (engl.: „DNA-dependent activator of interferon (IFN)-regulatory factors“, auch bezeichnet als DLM1 oder ZBP1) (Takaoka et al., 2007). Sie konnten zeigen, dass der Rezeptor nach Überexpression die Typ I-IFN-Antwort auf dsDNA verstärkte und dass die Inhibition von DAI mittels siRNA die Typ I-IFN-Produktion nach Stimulation mit dsDNA verminderte (Takaoka et al., 2007). Die Existenz zusätzlicher DNA-Rezeptoren ist jedoch wahrscheinlich, da nachfolgende Studien eine DAI-unabhängige Immunantwort auf DNA, DNA-Viren und intrazelluläre Bakterien zeigen konnten (Lippmann et al., 2008; Ishii et al., 2008).

Innerhalb eines relativ kurzen Zeitraumes wurde ein weiterer DNA-Rezeptor von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben. Hierbei handelt es sich um AIM-2 (engl.: „absent in melanoma 2“), einem Protein der Hin-200-Familie, das in der Lage ist, DNA zu binden, ein Inflammasom zu bilden und nachfolgend die Produktion von IL-1 und IL-18 posttranslational zu regulieren (Hornung et al., 2009; Fernandes et al. 2010; Bürckstümmer et al., 2009). AIM2-defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber bakteriellen und viralen Infektionen (Jones et al., 2010, Rathinam et al., 2010).

IFI16 (engl.: „interferone inducible protein 16“), welcher zu gleichen Proteinfamilie gehört wie AIM2, wurde ebenfalls als zytosolischer Rezeptor für doppelsträngige DNA postuliert (Unterholzner et al., 2010). Diese Ergebnisse bedürfen jedoch der Bestätigung durch Gen-defiziente Mäuse.

Weitere Mechanismen der zytosolischen DNA-Erkennung wurden beschrieben. Zum einen kann DNA durch die RNA-Polymerase III in RNA umgeschrieben und nachfolgend durch RIG-I erkannt werden. Zum anderen könnten die kürzlich beschriebenen intrazellulären

Nukleinsäurerezeptoren, wie z.B. LRRFIP1 und LSm14A ebenfalls eine Rolle spielen (Yang et al., 2010; Li et al., 2012).

Kürzlich wurde zudem cGAS (engl.: „cyclic AMP-GMP synthase“) als zytosolischer DNA-rezeptor beschrieben (Wu et al., 2013). cGAS bildet nach DNA-Bindung das „second-messenger“-Molekül zyklisches AMP-GMP, welches nachfolgend an das Adaptermolekül Sting bindet (Wu et al., 2013; Sun et al., 2013).

STING (engl.: „stimulator of interferone genes“, auch bekannt als MITA oder MPYS) wurde erstmals 2008 als ein am endoplasmatischen Retikulum lokalisiertes Signalmolekül beschrieben, welches die Typ I-IFN-Antwort auf intrazelluläre DNA vermittelt (Ishikawa et al., 2008). Darüber hinaus kann STING auch direkt als Rezeptor die bakteriellen „second-messenger“-Moleküle zyklisches di-AMP und zyklisches di-GMP binden und erkennen (Burdette et al., 2011). Möglicherweise scheint auch die Helikase DDX41 in der Lage zu sein, diese beiden bakteriellen Moleküle im Wirtszellzytosol zu erkennen und über STING eine IRF/TBK-abhängige Typ I-IFN-Produktion zu vermitteln (Parvatiyar et al., 2012).

1.1.2. Reaktive Sauerstoffradikale (ROS)

Reaktive Sauerstoffradikale (engl.: „reactive oxygen species“, ROS) haben in vielen Organismen eine wichtige physiologische Funktion, sind aber auch an der Entstehung und Pathophysiologie vieler Krankheiten beteiligt.

Das grundlegende Molekül zur Ausbildung von ROS ist der molekulare Sauerstoff. Beim molekularen Sauerstoff handelt es sich um ein sogenanntes Biradikal, da beide Sauerstoffatome je ein ungepaartes Elektron aufweisen. Durch eine parallele Ausrichtung der Elektronen liegt molekularer Sauerstoff jedoch in einem relativ reaktionsträgen Zustand vor, den man auch als Grundzustand bezeichnet. Kommt es zu einer Veränderung dieser Anordnung der Elektronen, führt dies zu reaktionsfreudigeren Sauerstoffderivaten, die als Sauerstoffradikale (ROS) bezeichnet werden. Zu den radikalischen ROS gehören Superoxid [O_2^-], das Hydroxylradikal [OH], das Peroxylradikal [RO_2], das Alkoxyl-Radikal [RO] und das Hydroxyperoxyl-Radikal [HO_2]. Nicht radikalische ROS sind Wasserstoffperoxid [H_2O_2], hypochlorige Säure [$HOCl\alpha$], Ozon [O_3], Singulett Sauerstoff und Peroxynitrit [$ONOO-b$]. Die Umsetzung molekularen Sauerstoffs als zentrales Substrat der Atmungskette, wird durch verschiedenste Enzyme

unterstützt, darunter die Zytochrom-P450-Monooxygenase, die NADPH-Oxidase (Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphatase-Oxidase), die Xanthinoxidase und die Cyclooxygenase (Kirkinezos und Moraes, 2001). Ca. 90 % des gesamten, vom aeroben Organismus aufgenommenen Sauerstoffs wird von der Cytochromoxidase der Atmungskette in den Mitochondrien verbraucht, welche somit als Hauptquelle der intrazellulären ROS-Produktion dienen (Chance et al., 1979; Shigenaga et al., 1994). Die restlichen 10 % werden u.a. durch sogenannte membranständige NADPH-Oxidasen verbraucht. Letztere bewirken die Freisetzung von ROS durch phagozytierenden Zellen wie neutrophile Granulozyten und Makrophagen („respiratory burst“) und dienen damit der Abwehr von Pathogenen und dem Abbau von Fremdstoffen. NADPH-Oxidasen befinden sich jedoch auch in der Zellmembran anderer Zellen. Die hierbei gebildeten Radikale wirken auch als sogenannte „second messenger“ an zellulären Signalübertragungsprozessen mit (Block et al., 2009; von Lohneysen et al., 2008).

Das toxische Prinzip reaktiver Sauerstoffradikale basiert auf Wechselwirkungen mit zellulären Bestandteilen wie Proteinen, Lipiden, Kohlenhydraten und DNA. Reaktive Sauerstoffspezies sind in der Lage DNA-Strangbrüche zu induzieren, Onkogene bzw. Tumorsuppressorgene zu aktivieren und zu inhibieren, Enzyme und Proteine zu inaktivieren oder Lipidperoxidation auszulösen. Wegen ihrer hohen Reaktivität können sie praktisch mit allen molekularen Strukturen der Zelle reagieren, was je nach Lebensdauer des Radikals, Bildungsort und Reaktionspartner zu strukturellen und funktionellen Störungen bis zum Zelltod führen kann. Eine funktionsfähige Zelle verfügt jedoch über diverse antioxidative Schutzmechanismen. Kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffspezies oder freien Radikalen und den antioxidativen Schutzmechanismen, wie z. B. im Rahmen einer bakteriellen Infektion, spricht man von oxidativem Stress.

Im Endothel spielen reaktive Sauerstoffradikale eine wichtige Rolle bei der Vasodilatation. Eine Gefäßrelaxation hängt generell von der Balance zwischen der Stickstoffmonoxid (NO[•])-Produktion durch die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) und der NO-Inaktivierung durch freie Sauerstoffradikale ab (Fleming et al., 2003). Um einer frühzeitigen Inaktivierung durch ROS entgegenzuwirken, haben Endothelzellen diverse Schutzmechanismen zum Abbau von ROS entwickelt. Insbesondere sind Superoxidanionen, die durch die NADPH-Oxidasen produziert werden, maßgeblich für den frühzeitigen NO-Abbau und damit für die Einschränkung der endothelabhängigen Vasodilatation verantwortlich (Griendling et al., 2003). In primären humanen Endothelzellen sind hauptsächlich zwei NADPH-Oxidasen, NOX2 und NOX4 an der

ROS-Produktion beteiligt. Diese befinden sich überwiegend in der Membran des endoplasmatischen Retikulums. Sowohl bakterielle Komponenten als auch Zytokine sind dazu in der Lage endotheliale NADPH-Oxidasen zu aktivieren und somit die Akkumulation von ROS im vaskulären Lumen und innerhalb intrazellulärer Kompartimente zu induzieren (Thomas et al., 2008). Diese Akkumulation führt zu einer endothelialen Dysfunktion und somit zu einer erhöhten Anfälligkeit für Arteriosklerose (Lassègue et al., 2012). Auch auf die Integrität von Endothelzellen haben reaktive Sauerstoffradikale einen negativen Einfluss (van Wetering et al., 2003). Ein hohes Level an ROS führt ebenfalls zu einer NF- κ B -abhängigen Induktion der Inflammation (Shuvaev et al., 2011). Eine Interaktion von NOX4 und dem TLR4 konnte bereits in humanen Endothelzellen der Aorta nachgewiesen werden (Park et al., 2006). In einem NOX4-spezifischen „loss of function“-Modell, kommt es sowohl zu einer Hemmung der LPS-induzierten ROS-Produktion als auch zu einer verminderten inflammatorischen Antwort (ICAM-1, MCP-1, IL-8) (Park et al., 2006). Weitere RNAi-Experimente mit NOX2 und NOX4-spezifischer siRNA zeigten eine signifikante Inhibition der TNF- α -vermittelten Induktion von IL-1 β und IL-6 (Moe et al., 2011).

1.1.3. Autophagie

Als Autophagie bezeichnet man einen, in Eukaryonten hoch konservierten Prozess, zum Erhalt der zellulären Homöostase durch den Abbau zelleigener Bestandteile. Noch relativ neu ist die Beobachtung, dass es sich bei der Autophagie auch um einen Abwehrmechanismus der Wirtszelle gegenüber intrazellulären Pathogenen handelt (Gutierrez et al., 2004; Nakagawa et al., 2004). Mittels Autophagie werden zunächst abzubauende zytoplasmatische Bestandteile von einer Doppelmembranstruktur, die man auch als Autophagosom bezeichnet, umschlossen. Durch die Fusion mit Lysosomen kommt es zu einer Degradierung dieser Bestandteile innerhalb des auf diese Weise gebildeten Autophagolysosoms (Ravikumar et al., 2010).

Für den Ablauf der Autophagie sind die sogenannten ATG-Proteine (engl.: „autophagy-related-genes“) von essentieller Bedeutung. Diese ATG-Proteine lassen sich in vier funktionelle Gruppen unterteilen.

- I Einen Serin/Threonin-Kinase Komplex, der auf vorgeschaltete Signale wie die TOR (engl: „target of rapamycin“-)Kinase reagiert und u.a. bei Mangelbedingungen inaktiviert wird (ATG1, ATG13, ATG17).
- II Einen Lipid-Kinase Komplex, der die Vesikelbildung vermittelt (ATG6, ATG14, Vps34, Vps15).
- III Zwei Ubiquitin-ähnliche Konjugationswege, die an der Vergrößerung der Vesikel beteiligt sind (ATG5, ATG7, ATG10, ATG16, ATG8- und ATG5-ATG12).
- IV Einen Recycling-Weg, der für die Dissoziation von ATG-Proteinen von reifen Autophagosomen benötigt wird (ATG2, ATG9, ATG18) (Billmann-Born et al., 2011).

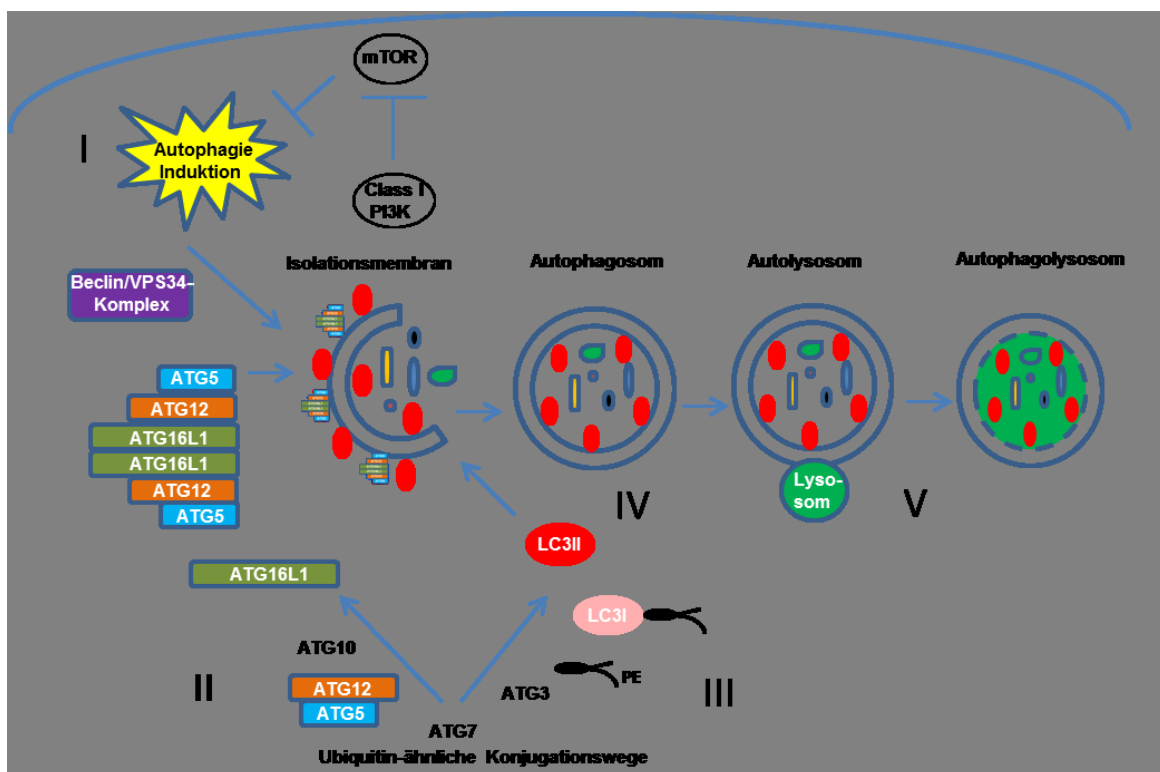


Abb. 3: Schematische Darstellung der Autophagosomen-Bildung. (I) Bildung einer Isolationsmembran mit Hilfe des Beclin/VPS34-Komplexes unter der Kontrolle der inhibierenden Kinase mTOR und der Phosphatidylinositol-3-kinase. (II) Entstehung des ATG5-

ATG12-ATG16L1-Komplexes und dessen Multimerisation an der Isolationsmembran. (III) Prozessierung von LC3 und dessen Insertion in die expandierende Phagophorenmembran, Punkt II und III werden mit Hilfe von Ubiquitin-ähnlichen Konjugationswegen durchgeführt (ATG10, ATG7 und ATG3). (IV) Aufnahme der zu verdauenden Bestandteile, Fertigstellung des Autophagosoms, einzelntes Recycling von LC3. (V) Fusion des Autophagosoms mit dem lysosomalen Kompartiment. Verändert nach Billmann-Born et al., 2011.

Die Autophagie ist in der Lage intrazelluläre Pathogene innerhalb des Zytosols und zum Teil auch innerhalb eines Phagosoms zu degradieren. Jedoch mehren sich die Hinweise darauf, dass die Autophagie unterschiedliche Bedeutungen in verschiedenen bakteriellen Infektionen haben kann (Ogawa et al., 2005; Yoshikawa et al., 2009; Gutierrez et al., 2004; Birmingham et al., 2006). So zeigen Studien mit *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium* und *Mycobacterium tuberculosis* eine restriktive Wirkweise der Autophagie, wohingegen es bereits erste Hinweise auf eine nicht-kanonische Autophagie gibt, die *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Brucella abortus* und uropathogenen *Escherichia coli* einen Wachstumsvorteil verschafft (Mostowy, 2013).

Der in dieser Arbeit untersuchte Rezeptor NLRX1 wurde im Rahmen einer Virusinfektion mit einer Verstärkung der Autophagie in Verbindung gebracht (Lei et al., 2012). Hierbei führt eine Interaktion des NLRX1-Bindungspartners TUFM mit dem autophagierelevanten Multiproteinkomplex aus ATG5, ATG12 und ATG16 zu Wechselwirkungen mit dem Autophagieprotein LC3, welches essentiell an der Bildung eines Autophagosoms beteiligt ist.

1.1.4. Typ I-IFN

IFN α und IFN β gehören zu den sogenannten Typ I-Interferonen (Typ-I IFN), bei denen es sich nicht nur, wie ursprünglich angenommen (Isaacs und Lindenmann, 1957), um die Haupteffektorzytokine der antiviralen Immunantwort handelt. Sie scheinen auch im Rahmen einer bakteriellen Infektion eine nicht unwesentliche Rolle zu spielen (Decker et al., 2005). Typ I-IFN bestehen aus IFN α (13 Subtypen), IFN β , IFN ϵ , IFN κ und IFN ω (Pestka et al., 2004) und sie können von nahezu allen Zelltypen wie z.B. Leukozyten, Fibroblasten und Endothelzellen gebildet werden (Bogdan et al., 2004). Die initiale Aktivierung des IFN-Signalweges wird durch die Detektion von PAMPs mittels verschiedenster sowohl extra-, als auch intrazellulärer Rezeptoren ausgelöst.

1.1.4.1. Interferon regulierende Faktoren (IRFs)

Die Expression der Typ I-IFN wird auf Transkriptionsebene reguliert, wobei Interferon regulierende Faktoren (engl.: „Interferon regulatory factors“, IRFs) dabei eine zentrale Rolle spielen (Hacker et al., 2006). Die Interferon regulierenden Faktoren IRF3 und IRF7 sowie der TNF-Rezeptor-assoziierte Faktor TRAF3, sind an der IFN β -Produktion essentiell beteiligt (Hacker et al., 2006). Jeder IRF besitzt eine konservierte DNA-bindende Domäne, welche an die DNA-Konsensussequenz ISRE (engl.: „interferone stimulated response element“) bindet. Die Promotorregion des IFN β -Gens besteht aus vier regulatorischen Elementen, den positiv regulatorischen Domänen (PRD I-IV). Es werden ausschließlich PRDI und PRDIII durch IRFs aktiviert. Die Aktivierung von PRDII und PRDIV hingegen erfolgt durch NF- κ B und ATF-2/c-Jun (Panne et al., 2004). Bei Säugetieren findet man neun verschiedene IRFs (IRF1-IRF9), von denen mindestens drei (IRF1, IRF3 und IRF7) an der positiven Regulation der IFN α/β -Transkription beteiligt sein können (Taniguchi et al., 2001).

Bei IRF3 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, welcher konstitutiv in nahezu allen Zellen exprimiert wird. Nach der Detektion von Pathogenen durch die Zelle werden spezifische Serinreste von IRF3 phosphoryliert. Damit kommt es zur Bildung von Homodimeren oder Heterodimeren mit IRF7, die dann in den Kern translozieren und die Expression verschiedener Typ I-IFN induzieren können (Marie et al., 1998; Lin et al., 2000). Für die Phosphorylierung und damit auch für die Aktivierung verantwortlich sind die Serin/Threonin-Kinasen TBK1 und IKK-i (IKK ϵ) (Fitzgerald et. al, 2004). Im Zellkern bindet IRF3 dann an die entsprechenden "interferon-stimulated-response-elements" (ISRE) der Zielgene und aktiviert so deren Expression.

IRF7 wurde zunächst als Repressor des EBV-kodierten Gens EBNA-1 beschrieben, welches ein ISRE-ähnliches Element enthält (Zhang et al., 1997) und starke Aminosäuresequenzhomologien mit IRF3 aufweist (Wathelet et al., 1998). Während IRF3 in nahezu allen Zelltypen konstitutiv exprimiert wird, hängt die IRF7-Expression in den meisten Zellen (mit Ausnahme von plasmazytoiden dendritischen Zellen, pDCs) von der Anwesenheit eines Typ I-IFN-Stimulus ab. Besteht keine Infektion, so exprimieren die Zellen nur in geringen Mengen IRF7. Kommt es jedoch zu einer Infektion, so steigt die IRF7-Synthese durch eine IRF3-abhängige Produktion von IFN β stark an (Decker et al., 2005). IRF7 hat aufgrund einer hohen Empfänglichkeit für eine Ubiquitin-abhängige Degradation nur eine sehr kurze Halbwertszeit, die bei 0,5 bis 1h liegt (Sato

et al., 2000). Diese strenge Regulation könnte als Schutzmechanismus der Wirtszelle dienen, um eine zu hohe Typ I-IFN-Konzentration und den damit einhergehenden schädigenden Einfluss auf die Zelle zu verhindern. Man unterscheidet zwei verschiedene Phasen der Typ I-IFN-Induktion: In der frühen Phase kommt es in Folge einer Virusinfektion zunächst zur Phosphorylierung und zu einer Homo- und Heterodimerisierung von IRF3 und IRF7. Anschließend translozieren diese dann in den Zellkern und es erfolgt die Bildung eines sogenannten Enhanceosoms, welches dann an den IFN β -Promotor bindet und mit Hilfe von CBP/p300 die Zielgenexpression (z. B. IFN α/β und das Chemokinen CXCL10) aktiviert (Maniatis et al., 1998; Yoneyama et al., 1998). In der späten Phase der Typ I-IFN-Induktion bindet sekretiertes IFN α/β auto- oder parakrin an den Typ I-IFN-Rezeptor, einem Heterodimer bestehend aus IFNAR1 und IFNAR2. Diese Bindung aktiviert den Transkriptionsfaktor ISGF-3, der wiederum in den Kern transloziert und dort eine IRF7-Expression induziert. Erfolgt nun ein Stimulus durch eine Virusinfektion, z. B. mit viralen Nukleinsäuren, so führen diese nach Erkennung zur Produktion von großen Mengen Typ I-IFN und komplettieren somit eine positive Rückkopplungsreaktion (Taniguchi et al., 2006). Die Zusammenhänge der verschiedenen IFN β -Signalwege sind schematisch in Abb. 4 dargestellt.

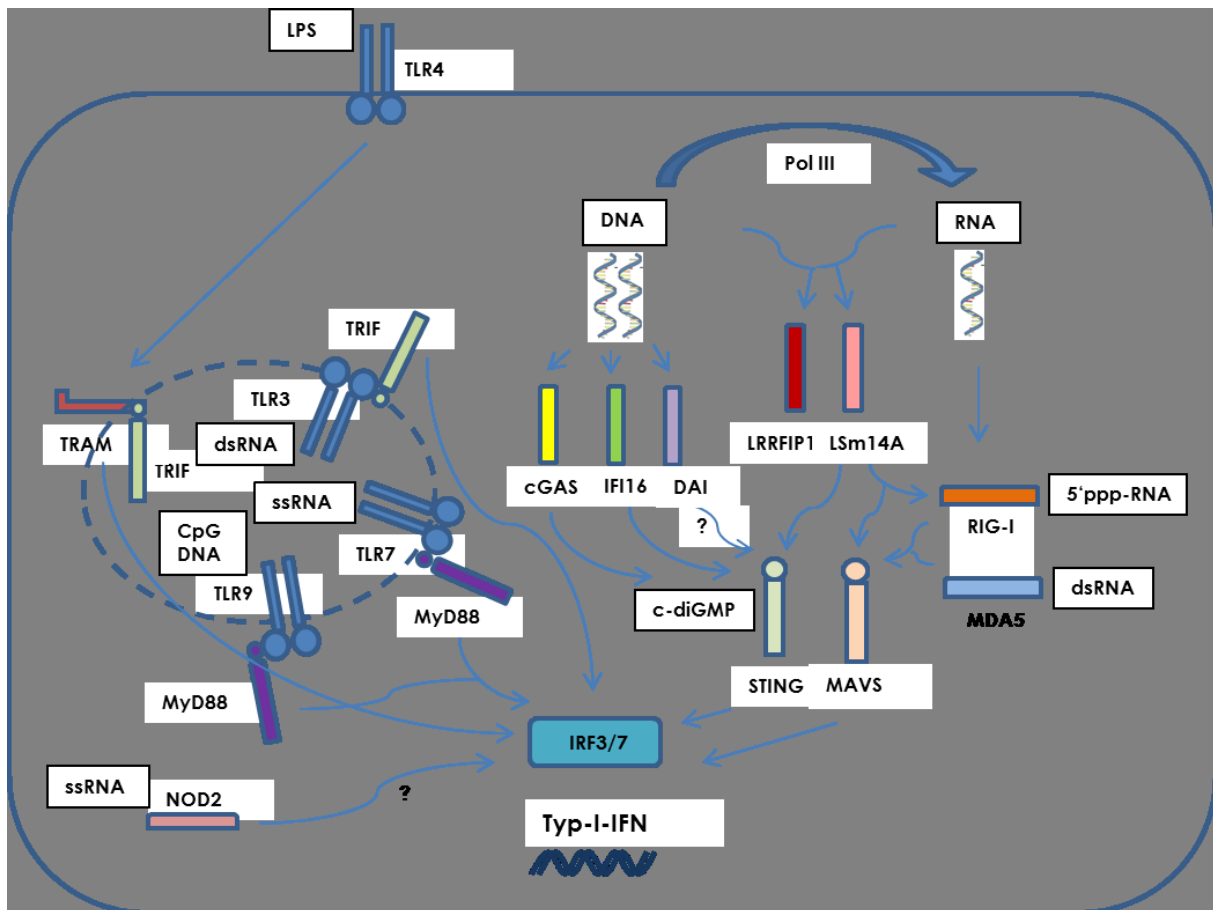


Abb. 4: Schematische Darstellung des IFN β -Signalweges. Sowohl extrazelluläre als auch endosomale TLRs erkennen mikrobielle Komponenten wie LPS (TLR4) oder Nukleinsäuren (TLR3, TLR7 und TLR9) und aktivieren somit die Adapterproteine TRIF/TRAM sowie MyD88. Diese bewirken eine Induktion von IFN β via IRF3 und/oder IRF7. NOD2 scheint nach Bindung von viraler ssRNA ebenfalls IRF3-vermittelt IFN β induzieren zu können. Die Weiterleitung des Signals nach Bindung von RNA an die RLRs erfolgt via MAVS. Die DNA bindenden Rezeptoren wie cGAS und IFI16 aktivieren den IFN β -Signalweg über das Adaptermolekül STING. STING scheint darüber hinaus in der Lage zu sein, bakterielles c-di-GMP und c-di-AMP direkt zu binden.

1.1.4.2. Antibakterielle Funktionen von Typ I-IFN

Typ I-IFN binden alle an den gleichen Rezeptor, den IFN- α -Rezeptor (IFNAR). Nach Bindung an die Untereinheit IFNAR1 kommt es zur Heterodimerisierung des Rezeptorkomplexes (IFNAR1/IFNAR2) (Mogensen et al., 1999). Anschließend werden die rezeptorgebundenen Janus-Kinasen Jak-1 und Tyk-2 aktiviert. Diese Aktivierung hat die nachfolgende

Phosphorylierung zytoplasmatischer STAT-Proteine zur Folge. Im Falle von IFN α und IFN β verläuft die Signalweiterleitung über den Transkriptionsfaktor ISGF-3, welcher aus aktivierten STAT1- und STAT2-Proteinen sowie dem IRF9-Protein aufgebaut ist (Fu et al., 1990; Veals et al., 1992). Dieser Komplex transloziert nun in den Zellkern und schaltet die Expression hunderter verschiedener Gene an, die ein "interferon stimulated response element" (ISRE) in ihrem Promotor aufweisen und als Interferon stimulierte Gene (ISGs) bezeichnet werden (Levy et al., 1986). Hierzu gehört neben vielen antiviralen Proteinen unter anderem die induzierbare Nitritoxid-Synthase (iNOS), die protektive Effekte gegenüber Bakterien wie *Chlamydia trachomatis* und *Burkholderia pseudomallei* aufweist (Devitt et al., 1996). Durch ein weiteres ISG, der Indolamin2,3-dioxygenase (IDO) kommt es zu einer Restriktion der Tryptophanverfügbarkeit und somit zu einem negativen Effekt auf das Wachstum von Streptokokken, Enterokokken und *Chlamydophila pneumoniae* (Däubener and MacKenzie, 1999; Njau et al., 2009). Darüber hinaus wird auch die Bildung sogenannter Interferon-regulierter GTPasen (IRGs) induziert, die antibakterielle Effekte gegenüber intrazellulären Pathogenen wie *Toxoplasma gondii*, *Salmonella* und *Shigella* vermitteln (Howard, 2008; Bukholm et al., 1984; Niesel et al., 1986).

Die Auswirkungen der Typ I-IFN auf verschiedenste Zellen sind vielfältig und reichen von der Aktivierung von Immunzellen, wie z. B. B- und T-Zellen, Makrophagen und natürliche Killerzellen bis hin zur Inhibierung der entero-bakteriellen Invasion in Fibroblasten und Epithelzellen sowie der Steigerung der virusvermittelten Apoptose in Makrophagen (Jego et al., 2003; Rogge et al., 1997; Rollag et al., 1984; Nguyen et al., 2002; Decker et al., 2005; Tanaka et al., 1998). Ein wichtiger Aspekt in der frühen Phase der Immunreaktion ist die IFN α und IFN β -vermittelte Induktion der MHC-Klasse-I-Expression. (Biron, 1998). Auf diese Weise wird die Präsentation von Antigenen auf infizierten Körperzellen vervielfältigt und so dem Immunsystem leichter zugänglich gemacht. Im Allgemeinen begrenzen die Typ I-Interferone somit die virale Ausbreitung. Darüber hinaus vermitteln sie die Abtötung infizierter Zellen und die Aktivierung und Expansion von Lymphozyten, welche für eine Kontrolle intrazellulärer Infektionen essentiell sind. Somit stellen die Typ I-Interferone einen Abwehrmechanismus dar, der eine Brücke zwischen angeborener und erworbener Immunantwort bildet.

Verglichen mit der gut untersuchten Rolle der Typ I-IFN in viralen Infektionen, ist die Bedeutung dieser Zytokine in nicht-viralen Infektionen vergleichsweise wenig untersucht. In den achtziger Jahren wurde erstmals eine Induktion der Typ I-Interferone nach bakteriellen Infektionen,

sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beschrieben. Eine Behandlung von Makrophagen und Neutrophilen mit Typ I-IFN zeigte eine verstärkte antimikrobielle Aktivität gegenüber *Chlamydia psittaci*, *Mycobacterium avium*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania spp.* oder auch *Candida albicans*-Infektionen. Besonders verstärkt wird diese Aktivität durch Endotoxine (LPS) (Nakane et al., 1982; Diez et al., 1989; Passwell et al., 1986; Carlin et al., 1989; Schmitz et al., 1989 und Denis, 1991). Weitere Studien zeigten, dass die intrazelluläre Replikation von Legionellen und Shigellen durch Typ I-IFN limitiert wird (Hess et al., 1989; Opitz et al., 2006). Mäuse mit defizientem IFNAR zeigten eine erhöhte Bakterienlast nach Infektion mit *S. pneumoniae*, *E. coli* und *Legionella pneumophila* (Mancuso et al., 2007; Lippmann et al., 2011). Bislang konnte jedoch auch gezeigt werden, dass sich nach bakterieller Infektion gebildetes Typ I IFN auch schädliche Auswirkungen auf den Wirt haben kann (Auerbuch et al., 2004; Bouchonnet et al., 2002; Carrero et al., 2004; Manca et al., 2001; O'Connell et al., 2004; Stanley et al., 2007).

1.2. *Chlamydomydia pneumoniae*

Chlamydien sind gram-negative Bakterien welche zur Ordnung der Chlamydiales gehören. Phylogenetische Analysen, insbesondere der 16s und 23s -rRNA führten Ende der neunziger Jahre zu einer überarbeiteten Taxonomie (Everett et al., 1999). Die Ordnung Chlamydiales besteht aus den vier Familien Chlamydiaceae, Parachlamydiaceae, Waddliaceae, und Simkaniaceae. Die human- und tierpathogenen Chlamydien gehören zur Familie der Chlamydiaceae, in der die bisher einzige Gattung *Chlamydia* in zwei Gattungen *Chlamydomydia* (*Chlamydomydia pneumoniae*, *Chlamydomydia psittaci*) und *Chlamydia* (*Chlamydia trachomatis*) unterteilt wurde (Everett et al., 1999; Bush und Everett, 2001).

Bei *Chlamydomydia pneumoniae* handelt es sich um ein obligat intrazelluläres Bakterium, welches einen zweiphasigen Entwicklungszyklus durchläuft. Zu Beginn der Infektion invadieren die extrazellulären, infektiösen und metabolisch inaktiven Elementarkörperchen (engl.: „elementary bodies“, EBs) die Wirtszelle (Higashi et al., 1965). Als Wirtszelle können dem Bakterium die verschiedensten Zelltypen dienen, darunter zirkulierende Makrophagen, arterielle glatte Muskelzellen und vaskuläre Endothelzellen (Mussa et al., 2006). Intrazellulär wird nun ein Einschlusskörper (griechisch: „chlamyd“: Mantel, Hülle; auch Inklusion) gebildet, in welchem sich die infektiösen EB's zu metabolisch aktiven Netzkörperchen (engl.: "reticulate bodies",

RBs) differenzieren. Anschließend beginnt die Replikation durch Zweiteilung und die Differenzierung von RBs in EBs, welche schließlich nach ca. 48 bis 72 h freigesetzt werden.

Neben dem beschriebenen Vermehrungszyklus gibt es noch eine andere Verlaufsform der Infektion mit *C. pneumoniae*, die Persistenz. Verschiedenste Faktoren wie z. B. Antibiotika, das Fehlen von essentiellen Aminosäuren und Glucose und die Anwesenheit von IFN γ können eine persistierende *C. pneumoniae*-Infektion auslösen (Beatty et al., 1994). Charakteristisch für dieses Stadium sind Einschlüsse aberranter Form, welche sich nicht wieder zu EBs differenzieren. Möglicherweise spielt diese persistierende Form der Infektion eine wichtige Rolle in der Pathogenese bedeutender chronischer Erkrankungen wie Arteriosklerose, Asthma und Arthritis (Kuo et al., 1995; Hahn et al., 2000; Laurila et al., 1997; Saikku et al., 1988). Der Hauptinfektionsweg ist die Inhalation erregerrhaltiger Aerosole. Die meisten Infektionen mit *C. pneumoniae* verlaufen mild und weitgehend asymptomatisch, jedoch kann der Erreger auch eine Reihe verschiedener Erkrankungen des oberen und unteren Respirationstraktes hervorrufen, wobei hier am häufigsten Bronchitiden und interstitielle Pneumonien auftreten. Die Seropositivitätsrate von *Chlamydomphila pneumoniae* in der deutschen Bevölkerung liegt bei 80 %. *Chlamydomphila pneumoniae*-Pneumonien treten weltweit auf. Eine Studie beschreibt *Chlamydomphila pneumoniae* als ursächliches Pathogen in 8 % aller Pneumonie-Fälle in Nordamerika, 6 % in Europa, 6 % in Lateinamerika und jeweils 5 % in Asien und Afrika (Arnold et al., 2007). Im Gegensatz zu *Chlamydia trachomatis* wurde bislang nur ein Serotyp von *Chlamydomphila pneumoniae* beschrieben (TWAR).

Innherhalb der *Chlamydiaceae* existiert eine konstitutive Resistenz gegenüber Aminoglykosiden und Glykopeptiden. Obwohl sowohl *C. trachomatis* als auch *C. pneumoniae* die genomische Voraussetzung zur Synthese von Peptidoglykan und Penicillin-bindenden Proteinen aufweisen, konnte keine Sensitivität auf Penicillin und Amoxicillin *in vivo* nachgewiesen werden (Rockey et al., 2000). Diese Tatsache bezeichnet man auch als das „chlamydiale Paradoxon“, bzw. die „chlamydiale Anomalie“ (Ghysen et al., 1999). Chlamydien sind empfindlich auf Antibiotika, die in die bakterielle Proteinbiosynthese eingreifen oder mit der DNA interagieren, wie Tetrazykline, Chinolone und Makrolide (Hammerschlag, 2002). Bislang gibt es keine nennenswerten Hinweise auf Resistenzentwicklungen innerhalb der *Chlamydiaceae*. Ein Hauptcharakteristikum der Chlamydieninfektion ist die Fähigkeit dieser Erreger, innerhalb der Wirtszelle monate- oder jahrelang durch eine persistente Infektion zu verweilen. In diesem Zustand verhalten sie sich

refraktär gegenüber Antibiotika und sind metabolisch nahezu inaktiv. Die Wirtszellfunktion wird durch die Persistenz kaum beeinträchtigt.

1.2.1. Lebenszyklus

Zu Beginn eines Infektionszyklus bindet das infektiöse, elektronendichte, ca. 0,3 µm große Elementarkörperchen (EB) u.a. mit Hilfe elektrostatischer Prozesse an die Wirtszellmembran und wird anschließend von der Wirtszelle über einen Mikrotubuli-unabhängigen Endozytoseprozess aufgenommen (Zhang et al., 1992; Campbell et al., 2004). Der intrazelluläre Entwicklungszyklus geht mit der Bildung einer Vakuole einher, die als Inklusion (Einschlusskörper) bezeichnet wird (Abb. 5). Die Inklusionsmembran erlaubt dem Bakterium die Aufnahme von essentiellen Aminosäuren, Nukleotiden und Lipiden der Wirtszelle (Hackstadt et al., 1995; Hatch, 1975a, b; McClarty, 1994; Moulder, 1991; Wylie et al., 1997). Unmittelbar nach der Infektion umhüllt die aus der Plasmamembran entstandene Inklusionsmembran das Elementarkörperchen. Innerhalb weniger Stunden wird diese dann mit Hilfe eines chlamydialen Typ-III-Sekretionssystems, u.a. durch die Insertion intrinsischer Membranproteine, sogenannter Inc-Proteine (engl.: „integral inclusion membrane protein“) modifiziert (Fields et al., 2003; Rockey et al., 1995, 2002; Shaw et al., 2000). Diese Modifikationen sind Auslöser für verschiedenste Interaktionsmechanismen mit der Wirtszelle. Sie führen unter anderem zu einer dynein-abhängigen Migration zum Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (Clausen et al., 1997; Grieshaber et al., 2003), zu einer Verhinderung des klassischen endosomalen Abbaus insbesondere der Fusion des Autophagosoms mit Lysosomen (Al-Younes et al., 1999; Fields & Hackstadt, 2002; Taraska et al., 1996; van Ooij et al., 1997; Wyrick, 2000) und der Fusion mit Vesikeln des Golgi-Apparates, welche die Chlamydien mit Sphingomyelin und Cholesterol versorgen (Carabeo et al., 2003; Hackstadt et al., 1996, 1997). Erst kürzlich konnten Heuer et al. die Chlamydien-induzierte Bildung von sogenannten „ministacks“ des Golgiapparates nachweisen (Heuer et al., 2009). Hierbei handelt es sich um eine Fragmentierung des Golgiapparates, die durch eine chlamydienassoziierte Spaltung des integralen Golgin84-Proteins verursacht wird (Heuer et al., 2009). Verantwortlich für diese Spaltung ist nach neuesten Studien die chlamydien-spezifische Protease CPAF (engl.: „chlamydial protease-like activity factor“) (Christian et al., 2011). Nur wenige Stunden nach der Internalisierung redifferenzieren die EBs zu ca. 1-1,5 µm großen und metabolisch aktiven RBs was sich unter anderem im Verlust der Infektivität, der Vergrößerung und dem Einsetzen der Replikation zeigt. Speziesabhängig beginnt

ca. 20 bis 48 h nach der Infektion die Bildung neuer infektiöser EBs, die am Ende des Zyklus über zwei verschiedene, nicht redundante Mechanismen wieder in den extrazellulären Raum freigesetzt werden können (Abb.5).

Beim ersten Mechanismus handelt es sich um die sogenannte (Aktin-vermittelte) Extrusion (Chin et al., 2012). Hierbei wird die Bakterienvakuole abgeschnürt und verlässt die Wirtszelle innerhalb eines membranumhüllten Kompartimentes. Bei diesem Vorgang bleibt die Wirtszelle intakt, wobei jedoch restliche Chlamydieninklusionen in der Wirtszelle verbleiben können. Beim zweiten Austrittsmechanismus handelt es sich um einen destruktiven Prozess, der durch Cystein-Proteasen vermittelt wird und sowohl eine Vakuolenruptur als auch eine Ruptur der Plasmamembran zur Folge hat. Aus der zerstörten Zelle werden dann alle infektiösen EBs freigesetzt (Hybiske und Stephens, 2007b; Hybiske und Stephens, 2008).

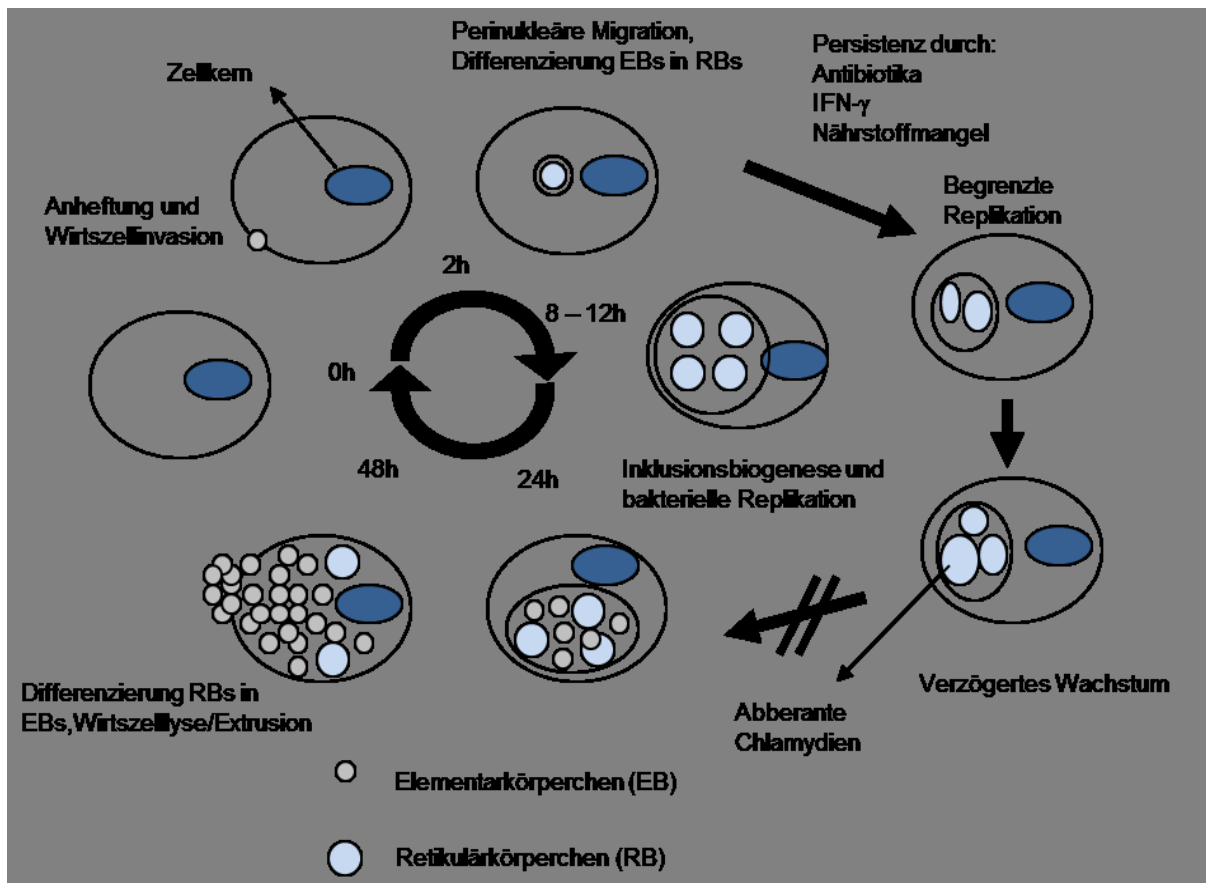


Abb. 5: Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus der Chlamydien. Die infektiösen Elementarkörperchen (EBs) heften sich an der Wirtszellmembran fest und werden über einen endozytotischen Prozess von einem membranumschlossenes Kompartiment (der Inklusion) umhüllt. Im Anschluss findet eine Differenzierung zur Vermehrungsform, dem Retikularkörperchen (RBs) statt, das sich schließlich wieder zu EBs redifferenziert. Durch Extrusion oder Zelllyse werden die EBs anschließend freigesetzt. Die persistente Form der Chlamydien bezeichnet man als aberrante Einschlusskörper (ABs), die sich durch ein verzögertes Wachstum auszeichnen.

Anhand des chlamydialen Entwicklungszyklus wird deutlich, dass eine erfolgreiche Replikation der Chlamydien nur durch die Interferenz mit der Wirtszelle ermöglicht wird. Welche Faktoren hierbei eine Rolle zu spielen scheinen, soll im Folgenden Erwähnung finden.

1.2.2. Virulenzfaktoren

Alle Bakterien des Phylums *Chlamydiae* haben die genetische Voraussetzung für einen Typ III-Sekretionsapparat (T3S-System). Hierbei handelt es sich um ein Proteintransportsystem, das von gram-negativen Bakterien genutzt wird um Effektorproteine direkt in die Wirtszelle zu injizieren (Peters et al., 2007). T3S-Systeme sind makromolekulare Strukturen, welche aus 20 bis 35 Proteinen bestehen und aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit einer Injektionsnadel auch als „Injektosom“ bezeichnet werden (Cornelis et al., 2006). Komponenten des chlamydialen Injektosoms konnten bislang in allen Infektionsstadien beobachtet werden. Bei den bisher identifizierten Substraten des chlamydialen T3S-Systems handelt es sich um die oben bereits erwähnten Inc-Proteine. Die genauen Funktionen dieser ca. 25 löslichen Proteine und ungefähr 40 bis 50 integralen Membranproteine sind bis heute noch weitestgehend unbekannt (Rockey et al., 1995; Fields und Hackstadt 2003). Ein Beispiel ist das IncA-Protein, das sich an der äußeren Inklusionsmembran befindet und unter anderem in der Lage ist lange Fasern auszubilden, an denen die Inklusionen sich weiter fortbewegen können um neue Inklusionen zu bilden (Suchland et al., 2005). Ein weiteres T3S-Effektorprotein ist das sogenannte Tarp-Protein (engl.: „Translocated actin-recruiting phosphoprotein“), das unter anderem während der Invasion von Epithelzellen von EBs transloziert wird und vermutlich an der Invasion durch eine Aktin-Rekrutierung beteiligt ist (Clifton et al., 2004). Es ist anzunehmen, dass die T3S-Substratproteine hierarchieabhängig transloziert werden, um in verschiedenen Infektionsstadien spezifisch Zellfunktionen zu manipulieren. Auch das Inklusionsmembranprotein Cpn0585 (*Chlamydophila pneumoniae* 0585) interagiert mit den verschiedensten Rab-GTPasen der Wirtszelle (Cortes et al., 2007). Ein weiterer entscheidender Virulenzfaktor ist die chlamydiale Protease CPAF (engl.: „chlamydial protease-like activity factor“). Hierbei handelt es sich um eine, innerhalb der *Chlamydiales* hochkonservierte, atypische Serin-Protease. Bei einer Infektion wird CPAF in das Wirtszellzytosol sekretiert und interagiert dort mit mindestens 16 verschiedenen Wirtszellproteinen. CPAF spielt nicht nur eine Rolle bei apoptotischen Prozessen und der Degradierung spezifischer Transkriptionsfaktoren der Wirtszelle, sondern ist auch an der Fragmentierung des Golgi-Apparates beteiligt (siehe oben; Christian et al., 2011).

Der Wandaufbau der Chlamydien entspricht im Wesentlichen dem allgemeinen Bauprinzip gram-negativer Bakterien, jedoch mit dem Unterschied einer fehlenden Peptidoglykanschicht („chlamydiales Paradoxon“). Die Festigkeit der Zellwand wird bei den Chlamydien durch Disulfid-Brücken verbundene, Cystein-reiche Proteine der Außenmembran erreicht (Hatch et al.,

1981). Chlamydien besitzen ebenfalls ein gattungsspezifisches LPS, welches als cLPS bezeichnet wird. Sowohl das cLPS als auch das chlamydiale Hitzeschockprotein 60 (chsp60) werden von den Chlamydien in großer Menge hergestellt und stehen im Verdacht, an pathologischen Prozessen der Arteriosklerose-Entwicklung beteiligt zu sein (Linanmaki et al., 1993; Kol et al., 1998). Die immunogene Potenz des cLPS liegt jedoch weit unter der des LPS aus Enterobakterien (Tsutsumi-Ishii et al., 2008). Weiterhin sind in die Chlamydienzellmembran zahlreiche Proteine (engl.: „outer membrane proteins“ = OMPs) eingelagert. Das Hauptmembranprotein (engl.: „major outer membrane protein = MOMP oder OMP-1“) macht ungefähr 60 % des Gesamtproteinanteils aus und trägt spezies- und serotypspezifische Epitope (Caldwell et al., 1981). Zudem wurde MOMP bereits in mehreren Studien als eines der zentralen Vakzinierungsantigene beschrieben (Farris et al., 2011).

1.2.3. Erkennung von *C. pneumoniae* durch das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem erkennt Chlamydien mit Hilfe von transmembranären und intrazellulären PRRs, welche nachfolgend die initiale Abwehrreaktion des Wirtes aktivieren sowie die verzögert einsetzende adaptive Immunantwort regulieren. So werden Chlamydien durch verschiedene Mitglieder der Toll-like Rezeptoren erkannt. Die Erkennung von chlamydialem LPS scheint hierbei eine wichtige Rolle zu spielen (Rodriguez et al., 2006). So zeigten Bulut et al. (2002 und 2009) eine durch chlamydiales LPS ausgelöste Aktivierung des TLR4/Myd88-Signalweges bei einer *C. pneumoniae*-Infektion (Bulut et al., 2002; Bulut et al., 2009). Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass TLR4/Myd88-defiziente Makrophagen in der Lage waren sowohl IFN α als auch IFN γ nach Infektion mit *Chlamydomphila pneumoniae* zu produzieren (Rothfuchs et al., 2004). Es konnte ausserdem gezeigt werden, dass auch TLR2 eine entscheidende Rolle bei der Abwehr einer respiratorischen Chlamydieninfektion in der frühen Lebensphase von Mäusen spielt. Hierbei kommt es, in Abwesenheit von TLR2, sowohl zu einer reduzierten Inflammation und Phagozytoseaktivität neutrophiler Granulozyten, als auch zu einer erhöhten Infektionsrate der Chlamydien (Beckett et al., 2012). Weitere Untersuchungen machen deutlich, dass nicht nur TLR2 und TLR4 eine Rolle bei der Chlamydienerkennung zu spielen scheinen, sondern auch der sich in intrazellulären Endosomen befindliche TLR9 beteiligt zu sein scheint (Netea et al., 2004). Studien mit unmethylierter chlamydialer CpG-DNA zeigten ebenfalls eine Aktivierung von TLR9 (Ouburg et al., 2009). Kürzlich wurde zudem eine Beteiligung von TLR3 an der Aktivierung von murinen Epithelzellen durch *Chlamydia*

muridarum aufgezeigt (Derbigny et al., 2012). Wie es bei der Chlamydieninfektion zu einer Bildung von Doppelstrang RNA, dem Liganden von TLR3 kommt, ist bisher noch unbekannt.

Da es sich bei *Chlamydomonas pneumoniae* um einen obligat intrazellulären Erreger handelt, liegt eine Beteiligung intrazellulärer Rezeptoren sehr nahe. So sind die NLRs kritische Faktoren in der Initiierung der angeborenen Immunantwort auf eine Infektion mit *Chlamydomonas pneumoniae*. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass NOD1 an der Erkennung von Chlamydien beteiligt ist (Opitz et al., 2005; Welter-Stahl et al., 2006). Eine Überexpression von NOD1 oder NOD2 in HEK293-Zellen erlaubte eine Erkennung von *C. pneumoniae* und eine NF-κB-Aktivierung (Opitz et al., 2005). Andersherum reduzierte die siRNA-vermittelte Expressionshemmung von NOD1 in humanen Endothelzellen die *C. pneumoniae*-stimulierte IL-8-Produktion (Opitz et al., 2005). Mäuse, denen das Gen für das im NOD1/2-Signalweg essentielle Signalmolekül RIP2 (engl: „receptor interacting protein-2“) fehlte, zeigten eine stark erhöhte Bakterienlast nach einer Infektion mit *Chlamydomonas pneumoniae* im Vergleich zu Wildtypmieren (Shimada et al., 2009).

Neben NOD1 und NOD2 ist NLRP3 ein weiteres NLR-Molekül, welches einen entscheidenden Beitrag zu der angeborenen Immunantwort auf eine Chlamydieninfektion leistet. So verdeutlicht eine Studie von 2010 erstmals die Bedeutung von NLRP3 bei einer *C. pneumoniae*-induzierten Inflammation mit Hilfe von NLRP3-defizienten Mäusen (He et al., 2010). Eine weitere Studie bestätigte die Beteiligung von NLRP3 an der *C. pneumoniae*-induzierten IL-1-Sekretion (Shimada et al., 2012). Schließlich ist es unserer Arbeitsgruppe gelungen zu zeigen, dass die *C. pneumoniae*-vermittelte Induktion von IL-1 nicht nur NLRP3-abhängig ist, sondern die GTPase Rac essentiell daran beteiligt zu sein scheint (Eitel et al., 2012).

Ebenso wurde in einer kürzlich publizierten Arbeit aufgezeigt, dass *Chlamydia trachomatis* über das NLR-Molekül NLRX1 verstärkt ROS induziert und dass dieser Mechanismus das Chlamydienwachstum positiv beeinflusst (Abdul-Sater et al., 2010). Hierbei wird vermutet, dass die NLRX1-vermittelte ROS-Produktion zu einer NLRP3-abhängigen Aktivierung von Caspase-1 führt, welche wiederum für eine Spaltung von Golgin-84 verantwortlich sein könnte (Abdul-Sater et al., 2010; Heuer et al., 2009). Diese Spaltung bewirkt eine Fragmentierung des Golgi-Apparates der Wirtszelle und führt somit zu einer erleichterten Nährstoffaufnahme und zu einem Wachstumsvorteil für die Chlamydien (Heuer et al., 2009).

Chlamydien haben im Laufe der Evolution eine Reihe von Mechanismen entwickelt, der Erkennung und Bekämpfung durch das angeborene Immunsystem zu entgehen. Nicht zuletzt ist ihnen die Existenz eines membranumhüllten Kompartiments, der Inklusion, hierbei sehr hilfreich. So haben verschiedenste Mikroorganismen, darunter auch Chlamydien (Heinzen et al., 1996), Mechanismen entwickelt, dem lysosomalen Abbau zu entgehen (Campoy und Colombo, 2009b; Orvedahl und Levine, 2009). Weiterhin interagieren zellautonome Abbauprozesse wie die Autophagie ebenfalls mit intrazellulären Signalmolekülen und Effektoren und haben somit unter anderem durch Beeinflussung der Lysozym-Sekretion, des Ubiquitin-Signalweges und der Antigenpräsentation auch eine indirekte protektive Funktion (Brodsky und Medzhitov, 2009; Shahnazari und Brumell, 2011). Autophagie scheint zudem auch Inflammasome negativ zu regulieren (Sumpter und Levine, 2010). Auch reaktive Sauerstoffradikale sind an der Regulation autophagischer Prozesse beteiligt (Azad et al., 2009; Scherz-Shouval and Elazar, 2011). Kommt es zu Defekten im Autophagie-Prozess z. B. durch die Reduktion von LC3 mittels RNAi oder Inhibition der Azidifizierung des Lysosoms durch BafA, führt dies zu einer negativen Beeinflussung des chlamydialen Entwicklungszyklus (Ouelette et al., 2011; Al-Younes et al., 2011). Hierbei wird vermutet, dass die aus dem lysosomalen Abbau resultierende Verfügbarkeit der Aminosäuren, insbesondere für *Chlamydomonas pneumoniae* eine essentielle Rolle zu spielen scheint (Ouelette et al., 2011).

1.3. Zielstellung der Arbeit

Chlamydophila pneumoniae ist ein wichtiger Erreger von Infektionen des Respirationstraktes. Zudem wird kontrovers diskutiert, ob *Chlamydophila pneumoniae* Infektionen unter anderem durch die Förderung inflammatorischer Reaktionen in Endothelzellen und anderen Zellen zur Ausbildung vaskulärer Läsionen und subsequenter Arteriosklerose beiträgt (Watson und Alp, 2008). Darüber hinaus sind Endothelzellen Zielzellen wichtiger anderer bakterieller Pathogene. Bisher ist jedoch nur wenig über die zellautonomen, angeborenen Erkennungs- und Abwehrmechanismen in der Infektion mit Chlamydien und anderen intrazellulären Bakterien in Endothelzellen bekannt.

Ziel dieser Dissertation war es daher, die Erkennungs- und Abwehrfunktionen in humanen Endothelzellen während der Infektion mit *Chlamydophila pneumoniae* weiterführend zu untersuchen. Zum einen wurde ein Mechanismus auf molekularer Ebene untersucht, bei dem die Erkennung von *Chlamydophila pneumoniae* zu einer Produktion von Typ I-IFN führt, die nachfolgend autokrin die intrazelluläre Replikation der Bakterien kontrollieren. Zum anderen konnte bei der Suche nach möglichen Regulatoren dieses Typ-I IFN-Signalweges das NLR-Molekül NLRX1 identifiziert werden, das über einen Typ I-IFN-unabhängigen Mechanismus das Wachstum der Chlamydien in den Zielzellen kontrolliert.

2. Ergebnisse

2.1. Lebende *C. pneumoniae* induzieren IFN β in primären humanen Endothelzellen

Die Mechanismen der Induktion von Typ I-IFN durch Bakterien ist bislang immer noch unzureichend geklärt und somit Gegenstand aktueller Forschungsprojekte. Im Folgenden sollte nun die Expression von IFN β nach Infektion mit *C. pneumoniae* in humanen Endothelzellen ermittelt werden. Hierbei wurden frisch isolierte humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) sowohl mit lebenden als auch mit hitzeinaktivierten *C. pneumoniae* infiziert, bzw. stimuliert. Die Infektion mit *C. pneumoniae* aktivierte eine zeit-, und dosisabhängige Produktion des IFN β -Proteins und der Expression von mRNA (Abb. 6A und B). Hitzeinaktivierte Chlamydien hingegen zeigten keine Induktion von IFN β nach Infektion mit *C. pneumoniae*.

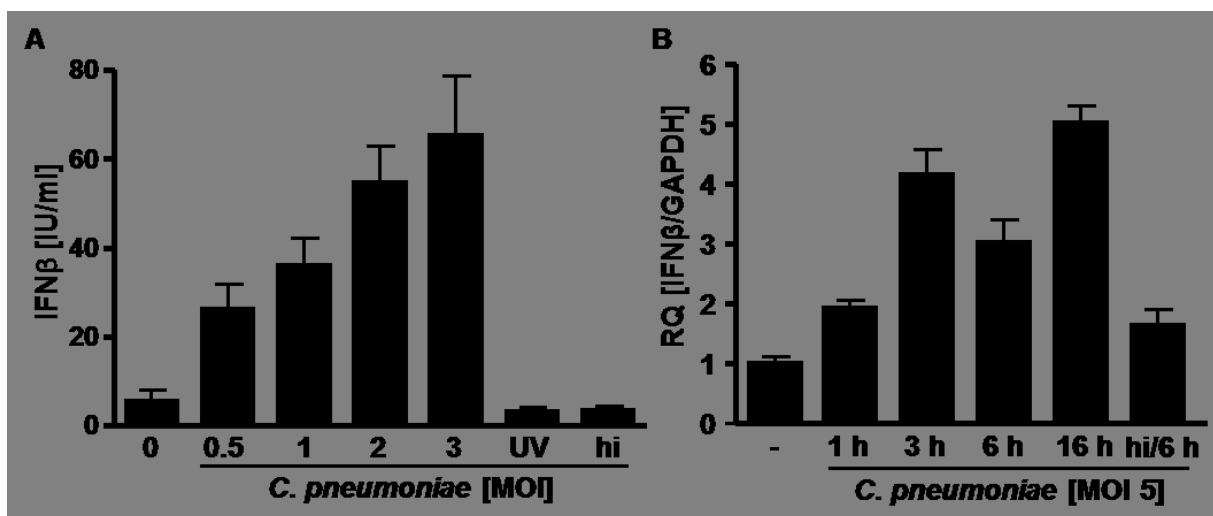


Abb. 6: Induktion einer IFN β -Produktion nach Infektion mit *C. pneumoniae* in HUVEC. HUVEC wurden mit *C. pneumoniae* (Stamm CWL029, lebend und inaktiviert (UV-/hitzeinaktiviert; je MOI3)) mit verschiedenen MOIs für 16 h, bzw. mit MOI 5 zu verschiedenen Zeitpunkten (1 bis 16 h) infiziert. [A] Die IFN β -Produktion wurde mit Hilfe eines ELISA ermittelt. [B] Zur Ermittlung der IFN β -mRNA wurde die quantitative RT-PCR (qRT-PCR) eingesetzt und mit der GAPDH-Expression normalisiert. Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Mittelwerte und deren Standardabweichungen von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

2.2. Die *C. pneumoniae*-vermittelte IFN β -Produktion ist IRF3-abhängig

Die Regulation der IFN β -Genexpression in virusinfizierten Zellen wird hauptsächlich durch die Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 reguliert. Nachfolgende Experimente sollen Aufschluss über eine mögliche Beteiligung dieser Transkriptionsfaktoren an der *C. pneumoniae*-induzierten IFN β -Induktion ergeben.

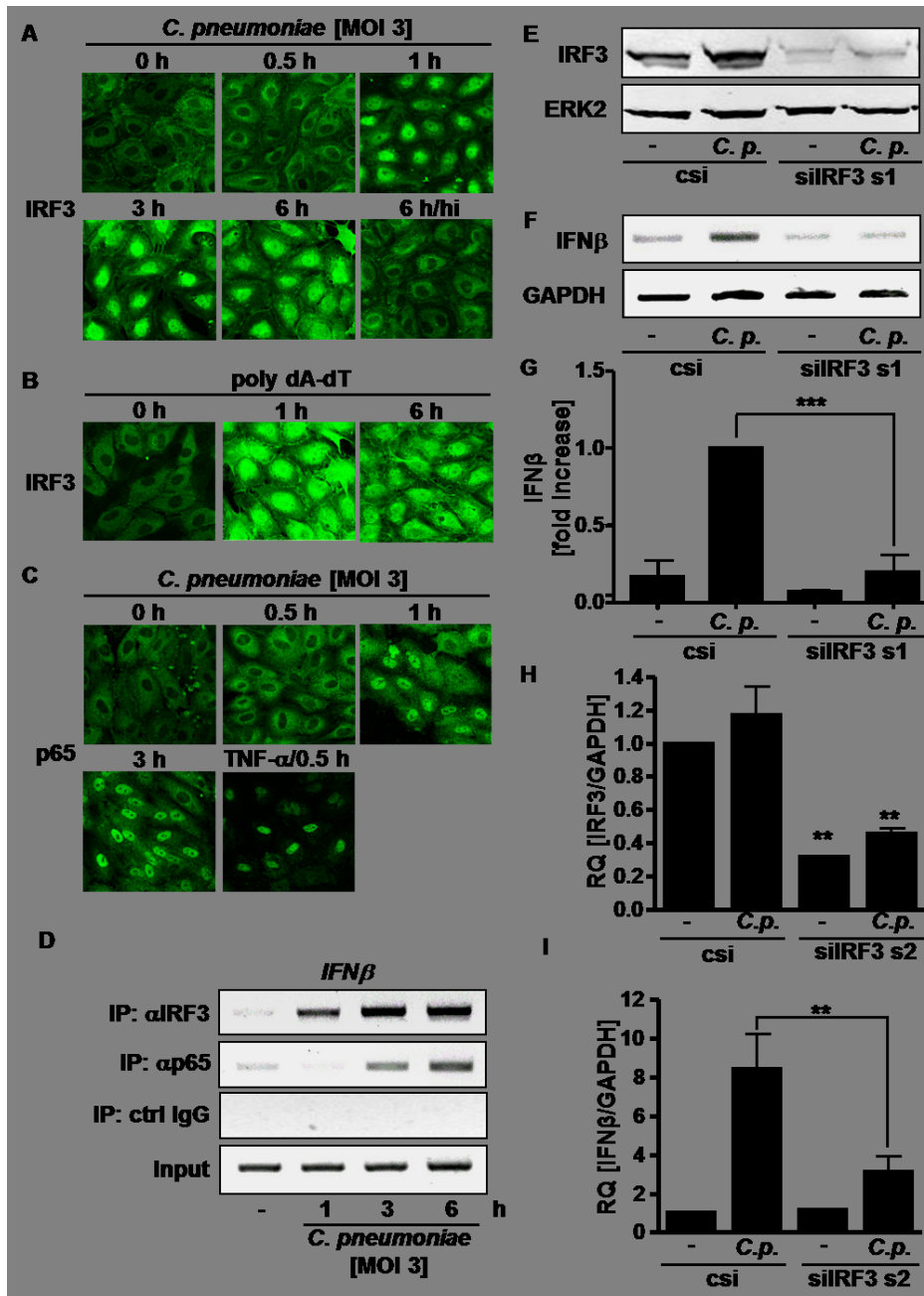


Abb 7: Beteiligung von IRF3 an der *C. pneumoniae*-induzierten IFN β -Induktion. HUVEC wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit *C. pneumoniae* infiziert oder mit poly dA-dT (0,1 μ g/ μ l), bzw. TNF- α (10 μ g/ml) stimuliert. Immunfluoreszenzfärbungen von IRF3 [A/B] und der

NF- κ B-Untereinheit p65 [C] wurden durchgeführt und mittels konfokaler Laserscanmikroskopie (Vergrößerung x 640) untersucht. [D] Infizierte Zellen wurden mit Hilfe des ChIP-Verfahrens und den entsprechenden Antikörpern (α -) sowie IFN β -Promoter-spezifischen Primern untersucht. Als Kontrolle wurde das IFN β -Promotersegment in Zelllysaten ohne vorherige Immunopräzipitation amplifiziert (Input). [E] HUVEC wurden mit Kontroll-siRNA (csi) sowie mit siRNA gegen IRF3 (siIRF3, s1: Sequenz 1, s2: Sequenz 2) transfiziert. IRF3 und ERK2 als Beladungskontrolle wurden mittels Western-Blot detektiert. [F/G] Kontroll-siRNA (csi) und siIRF3-transfizierte HUVEC wurden mit *C. pneumoniae* (MOI 5) infiziert. Nachfolgend wurde mittels RT-PCR [F] und ELISA [G] die mRNA- und Proteinproduktion von IFN β untersucht. [H, I] HUVEC wurden mit csi und siIRF3 transfiziert, nach 72 h mit *C. pneumoniae* infiziert und mittels qRT-PCR auf die IRF3- [H], bzw. IFN β -Expression [I] hin untersucht. Die Ergebnisse in A bis F sind jeweils repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Die in G-I dargestellten Ergebnisse zeigen die Mittelwerte und deren Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Die in G gezeigte Vervielfachung (engl.: „fold increase“) der IFN β Produktion bezieht sich auf den Wert der mit Kontroll-siRNA transfizierten und mit *C.p.* infizierten HUVEC (= 1). Die Ergebnisse der qRT-PCR [H, I] repräsentieren die Mittelwerte und deren Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten normalisiert auf die GAPDH-mRNA. Signifikante Unterschiede sind dargestellt mit ***p < 0,001; **p < 0,01).

Nach einer Aktivierung von IRF3 durch Phosphorylierung, kommt es zu einer Translokation vom Zytosol in den Zellkern, was sich konfokalmikroskopisch nachweisen lässt. Es zeigte sich, dass IRF3 nach Infektion mit *C. pneumoniae* in den Zellkern transloziert (Abb. 7A). Drei bis sechs Stunden nach der Infektion erreichte die Translokation von IRF3 in den Zellkern das Maximum (Abb. 7A). Hitzeinaktivierte Chlamydien waren nicht in der Lage, eine Translokation von IRF3 in den Zellkern zu induzieren (Abb. 7A).

Doppelsträngige B-DNA wird durch zytosolische PRRs wie z.B. cGAS detektiert und stimuliert nachfolgend eine IRF3-abhängige Typ I-IFN-Produktion (Wu et al., 2013; Sun et al., 2013). Das synthetische B-DNA-Analogon poly dA-dT wurde deshalb im Folgenden als Positiv-Kontrolle verwendet. Hierfür wurde poly dA-dT mittels eines lipid-basierenden Transfektionsreagens in die Zelle eingebracht. Poly dA-dT war ebenso in der Lage eine Kerntranslokation von IRF3 zu stimulieren (Abb. 7B).

NF- κ B bindet an die PRDII-Region des IFN β -Promotors und spielt neben den IRFs eine wichtige Rolle in der virus-induzierten Zusammensetzung des IFN β -Enhanceosoms (Thanos und Maniatis, 1995; Merika et al., 1998). Auch nach Infektion von Endothelzellen mit *C. pneumoniae* zeigte sich bereits nach 1 h eine deutliche Translokation der NF- κ B-Untereinheit p65 in den Zellkern (Abb. 7C).

Um die Bindung von IRF3 und p65 an den IFN β -Promotor genauer zu untersuchen, wurden Chromatinimmunpräzipitationen (ChIP) durchgeführt. Diese Experimente gaben deutliche Hinweise darauf, dass IRF3 und p65 nach Infektion mit *C. pneumoniae* an den IFN β -Promotor rekrutiert wurde (Abb. 7D).

Um direkt nachzuweisen, dass IRF3 an der *C. pneumoniae*-stimulierten IFN β -Induktion beteiligt ist, wurden RNAi-Experimente durchgeführt. Nach Transfektion von HUVEC mit spezifischer siRNA konnte eine starke Reduktion der Expression von IRF3 mittels quantitativer RT-PCR und Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 7H). Die Inhibition von IRF3 mittels siRNA führte zudem zu einer signifikanten Reduktion der *C. pneumoniae*-stimulierten IFN β -Expression (Abb. 7F, G). Zusammengefasst geben die dargestellten Ergebnisse deutliche Hinweise darauf, dass IRF3 in *C. pneumoniae*-infizierten Endothelzellen aktiviert wird und nachfolgend eine wichtige Rolle in der Induktion einer IFN β -Produktion einnimmt.

2.3. Die *C. pneumoniae*-vermittelte IFN β -Produktion ist IRF7-abhängig

Neben IRF3 ist IRF7 ein wichtiger Faktor in der virusinduzierten Typ I-IFN-Antwort. Nachfolgende Experimente sollten Aufschluss darüber geben, ob auch IRF7 an der *C. pneumoniae*-induzierten IFN β -Produktion beteiligt ist.

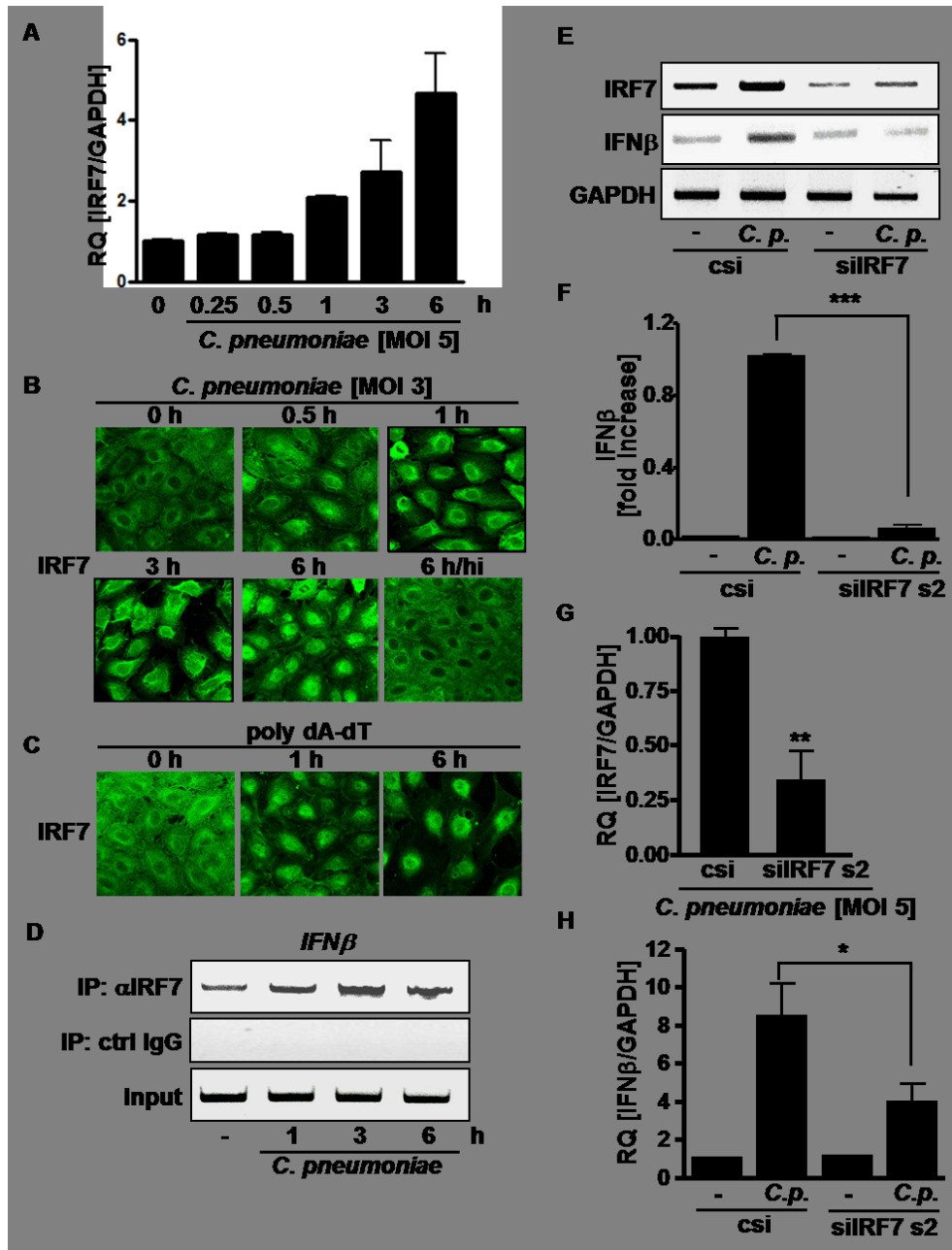


Abb. 8: Beteiligung von IRF7 an der *C. pneumoniae*-induzierten IFN β -Induktion. [A] HUVEC wurden für verschiedene Zeitintervalle mit *C. pneumoniae* infiziert (MOI 5) und mittels quantitativer RT-PCR auf die IRF7-Expression hin untersucht. [B/C] Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit *C. pneumoniae* infiziert oder mit poly dA-dT (0,1 μ g/ μ l) stimuliert. Anschließend wurden Immunfluoreszenzfärbungen von IRF7 durchgeführt und

mittels konfokaler Laserscanmikroskopie (Vergrößerung x 640) untersucht. [D] Mit *C. pneumoniae* infizierte HUVEC (MOI3) wurden mit Hilfe des ChIP-Verfahrens und den entsprechenden Antikörpern (anti-IRF7) untersucht. Als Kontrollwerte dienten die Detektion von IgG-Antikörpern (Negativkontrolle) und eine Amplifikation des IFN β -enhancer (Input, Positivkontrolle). [E-H] HUVEC wurden mit Kontroll-siRNA (csi) oder mit IRF7-siRNA (s1: Sequenz 1, s2: Sequenz 2) transfiziert und nach 72 h mit *C. pneumoniae* (MOI5) infiziert. [E] 6 h p.i. wurde die Expression von IRF7 [E, G] und IFN β [H] in der RT-PCR, bzw. qRT-PCR untersucht. [F] Zusätzlich wurde 16 h p.i. die Konzentration von IFN β in den Zellüberständen ermittelt. Die in B-E dargestellten Ergebnisse sind jeweils repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Bei den in F-H dargestellten Ergebnissen handelt es sich um die Mittelwerte und deren Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Die in F gezeigte Vervielfachung (engl.: „fold increase“) der IFN β Produktion bezieht sich auf den Wert der mit Kontroll-siRNA transfizierten und mit *C.p.* infizierten HUVEC (= 1). Die Ergebnisse der qRT-PCR [G, H] repräsentieren die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten normalisiert auf die GAPDH-mRNA. Signifikante Unterschiede sind dargestellt mit ***p < 0,001; **p < 0,01).

Quantitative PCR-Analysen zeigten, dass in *C. pneumoniae*-infizierten HUVEC die Expression von IRF7 ansteigt (Abb. 8A). Nach einer Aktivierung von IRF7 durch Phosphorylierung kommt es, wie bei IRF3, zu einer Translokation vom Zytosol in den Zellkern, was sich ebenfalls konfokalmikroskopisch nachweisen lässt. Es zeigte sich, dass IRF7 nach Infektion mit *C. pneumoniae* in den Zellkern transloziert (Abb. 8B). Sechs Stunden nach der Infektion erreichte die Translokation von IRF7 in den Zellkern das Maximum (Abb. 8B). Hitzeinaktivierte Chlamydien waren nicht in der Lage, eine Translokation von IRF7 in den Zellkern zu induzieren (Abb. 8B). Das synthetische B-DNA-Analogon poly dA-dT war ebenso in der Lage eine Kerntranslokation von IRF7 zu stimulieren (Abb. 8C).

Um die Bindung von IRF7 an den IFN β -Promotor genauer zu untersuchen, wurde ebenfalls eine ChIP durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass IRF7 nach Infektion mit *C. pneumoniae* an den IFN β -Promotor rekrutiert wurde (Abb. 8D).

Um direkt nachzuweisen ob auch IRF7 an der *C. pneumoniae*-stimulierten IFN β -Induktion beteiligt ist, wurden ebenfalls RNAi-Experimente durchgeführt. Nach Transfektion von HUVEC mit spezifischer siRNA konnte eine starke Reduktion der Expression von IRF7 mittels RT-PCR und qRT-PCR nachgewiesen werden (Abb. 8E, G). Die Inhibition von IRF3 mittels siRNA

führte zudem zu einer signifikanten Reduktion der *C. pneumoniae*-stimulierten IFN β -Expression (Abb. 8E, F, H). Zusammengefasst geben die dargestellten Ergebnisse deutliche Hinweise darauf, dass auch IRF7 in *C. pneumoniae*-infizierten Endothelzellen aktiviert wird und nachfolgend, wie IRF3, eine wichtige Rolle in der Induktion der IFN β -Produktion einnimmt.

2.4. Das Signalprotein MAVS beeinflusst die IRF3/7-abhängige IFN β -Produktion

Bei einer viralen Infektion führt die Bildung eines Komplexes zwischen RIG-I und dem mitochondrienassoziierten Adaptermolekül MAVS zu einer Rekrutierung zellulärer Kinasen wie z. B. TBK-1 oder IKK- ϵ , die wiederum zu einer Phosphorylierung von IRF3 und IRF7 führen und somit eine IFN β -Expression initiieren (Sato et al., 2000; Fitzgerald et al., 2003; Honda et al., 2005; Xu et al., 2005). Im Folgenden sollte nun die Bedeutung von MAVS bei der Induktion von IFN β nach einer Infektion mit dem intrazellulären Bakterium *Chlamydomonas pneumoniae* in Endothelzellen näher untersucht werden.

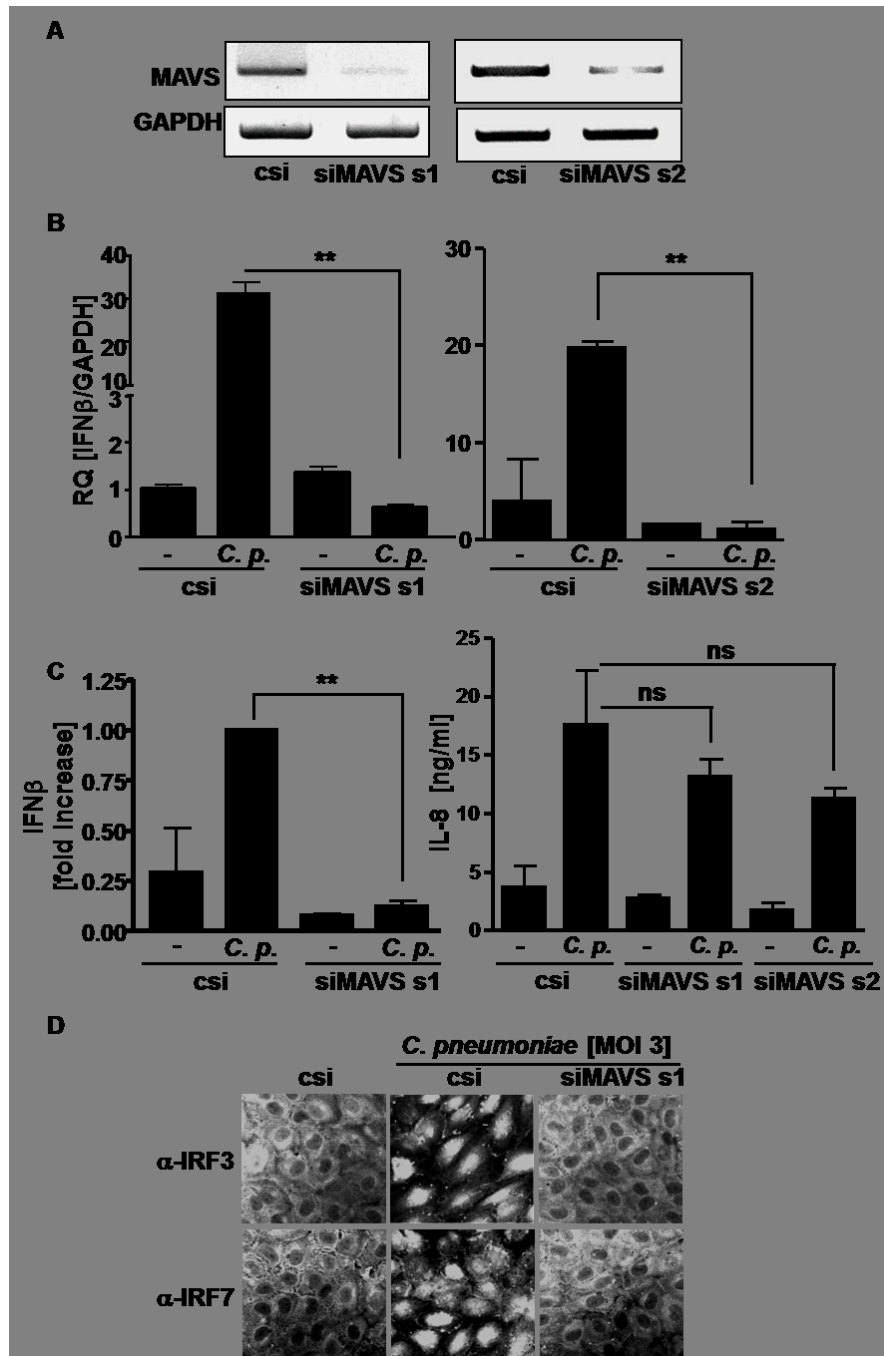


Abb. 9: Bedeutung von MAVS für die IFN β -Produktion in *C. pneumoniae*-infizierten HUVEC. [A] HUVEC wurden mit csi und zwei verschiedenen siRNA-Sequenzen gegen MAVS (s1, s2) transfiziert. Die Knockdown-Effizienz wurde nach 72 h Inkubation und 6 h Infektion mit *C. pneumoniae* (MOI 5) mittels RT-PCR überprüft. [B, C] Die *C. pneumoniae*-stimulierte IFN β -Induktion in den transfizierten HUVEC wurde mit Hilfe von qRT-PCR (6 h.p.i.) [B] und ELISA (16 h.p.i.) [C links] bestimmt. [C rechts] Als Kontrolle wurden zusätzlich die Konzentrationen von IL-8 in den Zellüberständen bestimmt (16 h p.i.). [D] Die IRF3/7-Translokation in den Zellkern wurde in csi- und siMAVS-transfizierten Zellen mittels konfokaler

Laserscanmikroskopie (Vergrößerung x 640) durchgeführt. Die in A und D dargestellten Ergebnisse sind jeweils repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Die in B und C dargestellten Ergebnisse stellen die Mittelwerte und deren Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten dar. Die in C (links) dargestellte Vervielfachung (engl.: „fold increase“) der IFN β Produktion bezieht sich auf den Wert der mit Kontroll-siRNA transfizierten und mit *C.p.* infizierten HUVEC (= 1). Die Ergebnisse der qRT-PCR in B zeigen die Mittelwerte und deren Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten normalisiert auf die GAPDH-mRNA. Signifikante Unterschiede sind dargestellt mit ***p < 0,001; **p < 0,01; ns = nicht signifikanter Unterschied).

Es wurden zunächst HUVEC mit MAVS-spezifischer siRNA behandelt und im Anschluss auf ihre IFN β -Expression hin untersucht. Die Transfektion von zwei verschiedenen MAVS-spezifischen siRNA-Sequenzen ergab eine signifikante Reduktion der MAVS Expression (Abb. 9A). Außerdem hatten beide MAVS-spezifischen siRNA-Sequenzen einen hemmenden Einfluß auf die IFN β -mRNA-Expression und die IFN β -Proteinproduktion im Zellüberstand im Vergleich zu csi-transfizierten Zellen (Abb. 9B, 9C links). Anders als die IRF-abhängige Produktion der Typ I-IFN wurde die Produktion des NF- κ B-abhängigen IL-8 nicht signifikant durch die MAVS-siRNAs gehemmt (Abb. 9C rechts). In konfokalmikroskopischen Analysen der Zellen zeigte sich zudem, dass die *C. pneumoniae*-stimulierte Zellkern-Translokation von IRF3 und IRF7 in HUVEC durch MAVS-siRNA inhibiert wurde (Abb. 9D).

2.5. Der MAVS-IRF3/7-Typ I-IFN-Signalweg beeinflusst die Vermehrung von *C. pneumoniae* in HUVEC

Um die Bedeutung des MAVS-IRF3/7-Typ I-IFN-Signalwegs für die zellautonome Abwehr gegen *C. pneumoniae* in HUVEC zu untersuchen, wurden im Folgenden verschiedene Methoden eingesetzt.

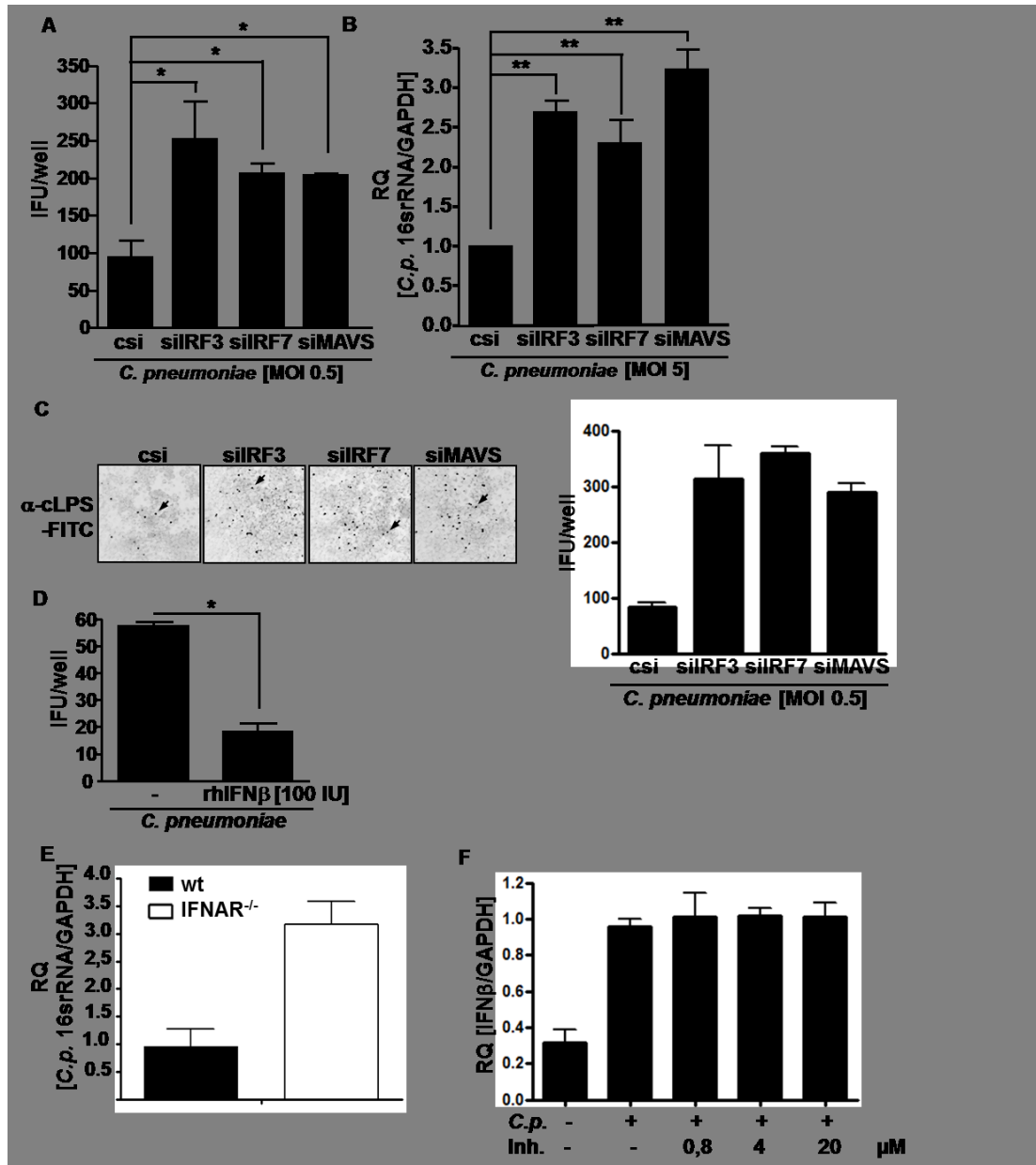


Abb. 10: Einfluss von MAVS, IRF3/7 und IFNβ auf die Replikation von *C. pneumoniae* in HUVEC. [A] HUVEC wurden mit Kontroll-siRNA (csi) sowie mit siRNA gegen IRF3, IRF7 oder MAVS transfiziert und für 72 h mit *C. pneumoniae* infiziert. Es erfolgte eine Färbung mit einem anti-Chlamydien-LPS-Antikörper und eine anschließende Untersuchung in der konfokalen

Laserscanmikroskopie (Vergrößerung x 640). Die chlamydiale Vermehrung wurde mittels mikroskopischer Auszählung der Inklusionen pro well bestimmt. [B] Die chlamydiale Vermehrung wurde außerdem mit Hilfe der qRT-PCR untersucht. [C] In einem Reinfektions-Experiment wurden HEp-2-Zellen mit Zellüberständen aus (csiRNA, siIRF3, siIRF7 und siMAVS) transfizierten, mit *C. pneumoniae* infizierten Zellen (MOI 0,5) für 48 h infiziert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Auszählung der *C. pneumoniae*-Inklusionen: siehe Pfeile; Vergrößerung x 640). [D] HUVEC wurden mit rekombinantem, humanem IFN β [100IU] 16 h inkubiert und anschließend mit *C. pneumoniae* (MOI 0,5) infiziert. Die Auszählung der Inklusionen pro well erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop. [E] IFNAR^{-/-} und Wildtyp-BMM wurden mit *C.pneumoniae* infiziert (MOI 3, 24 h). Anschließend wurde die chlamydiale Vermehrung mit Hilfe der qRT-PCR untersucht. [F] HUVEC wurden unbehandelt belassen oder mit *C. pneumoniae*. infiziert (MOI 3, 24 h) und mit verschiedenen Konzentrationen des RNA-Polymerase-III-Inhibitors ML60218 stimuliert (24 h). Es folgte eine Bestimmung der IFN β -Expression mittels qRT-PCR. Die dargestellten Ergebnisse aus den Abbildungen A, C (rechts), D, E und F stellen die Mittelwerte und die Standardabweichungen von drei, voneinander unabhängigen Experimenten dar. Die in C (links) dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Die Ergebnisse der qRT-PCR [B, E und F] zeigen die Mittelwerte und deren Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten normalisiert auf die GAPDH mRNA. Signifikante Unterschiede sind dargestellt mit ***p < 0,001; **p < 0,01).

Bei der Auszählung von *C. pneumoniae*-Inklusionen in HUVEC mittels Konfokalmikroskopie zeigte sich, dass die Hemmung der MAVS-, IRF3- und IRF7-Expression mit Hilfe von siRNA die Anzahl an Einschlusskörperchen signifikant erhöhte (Abb. 10A). Diese Beobachtung konnte mittels qRT-PCR-basierter Quantifizierung der Chlamydien-spezifischen RNA bestätigt werden (Abb. 10B). Reinfektionsexperimente in HEp-2-Zellen zeigten ebenfalls, dass die siRNAs gegen IRF3, IRF7 und MAVS zu einer erhöhten Anzahl chlamydialer Einschlusskörper in HUVEC im Vergleich zu csi-RNA transfizierten Zellen führte (Abb. 10C). Die Anzahl der Inklusionen war sowohl in HUVEC als auch in den HEp-2-Zellen um das 3 bis 4-fache erhöht (Abb. 10 A-C). Desweiteren zeigte sich, dass die exogene Zugabe von IFN β die chlamydiale Replikation in HUVEC hemmte (Abb. 10D). Experimente mit murinen Wildtyp- und IFNAR^{-/-} Knochenmarksmakrophagen zeigten, dass die Defizienz des Typ I-IFN-Rezeptors die Anzahl der chlamydialen RNA 24 h p.i. um das 3-4fache steigerte (Abb. 10E).

Eine Bindung bakterieller RNA durch RIG-I kann durch die Aktivität einer RNA-Polymerase III erreicht werden. Die RNA-Polymerase III wurde bereits als Detektor für virale und bakterielle DNA identifiziert, welcher RIG-I- und MAVS-vermittelt zur Induktion von IFN β führt (Ablasser et al., 2009; Chiu et al., 2010). In den hier dargestellten Ergebnissen hatte die Behandlung von Endothelzellen mit verschiedenen Konzentrationen des spezifischen RNA-Polymerase III-Inhibitors ML-60218 keinen Einfluss auf die IFN β -Induktion nach Infektion mit *Chlamydomophila pneumoniae* (Abb. 10F).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass MAVS, IRF3 und IRF7 die Aktivierung eines zellautonomen Abwehrmechanismus gegen *C. pneumoniae* in humanen Endothelzellen induzieren und dass dieser Mechanismus, unabhängig von der RNA Polymerase III, durch die Produktion von IFN β vermittelt wird.

2.6. Einfluss von NLRX1 auf die Vermehrung von *C. pneumoniae* in humanen Endothelzellen

In einigen kürzlich publizierten Arbeiten wurden Daten präsentiert, die Hinweise für eine Wechselwirkung des NLR-Moleküls NLRX1 mit dem MAVS/RIG-I-Signalweg liefern (Moore et al., 2008). Diese Daten deuten an, dass NLRX1 direkt mit MAVS interagiert und dadurch die antivirale RIG-I/MDA5-MAVS-abhängige Typ I-IFN-Produktion negativ reguliert (Moore et al., 2008; Lei et al., 2013). Der sich anschließende Effekt auf die IFN β -Induktion wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Rebsamen et al., 2011; Soares et al., 2013) (siehe auch Diskussion). Basierend auf diesen Publikationen und unseren Ergebnissen über die Funktion von MAVS in der zellautonomen angeborenen Immunantwort gegen *C. pneumoniae* in humanen Endothelzellen, wurde im Folgenden zunächst Expression und Funktion von NLRX1 in *C. pneumoniae*-infizierten HUVEC untersucht.

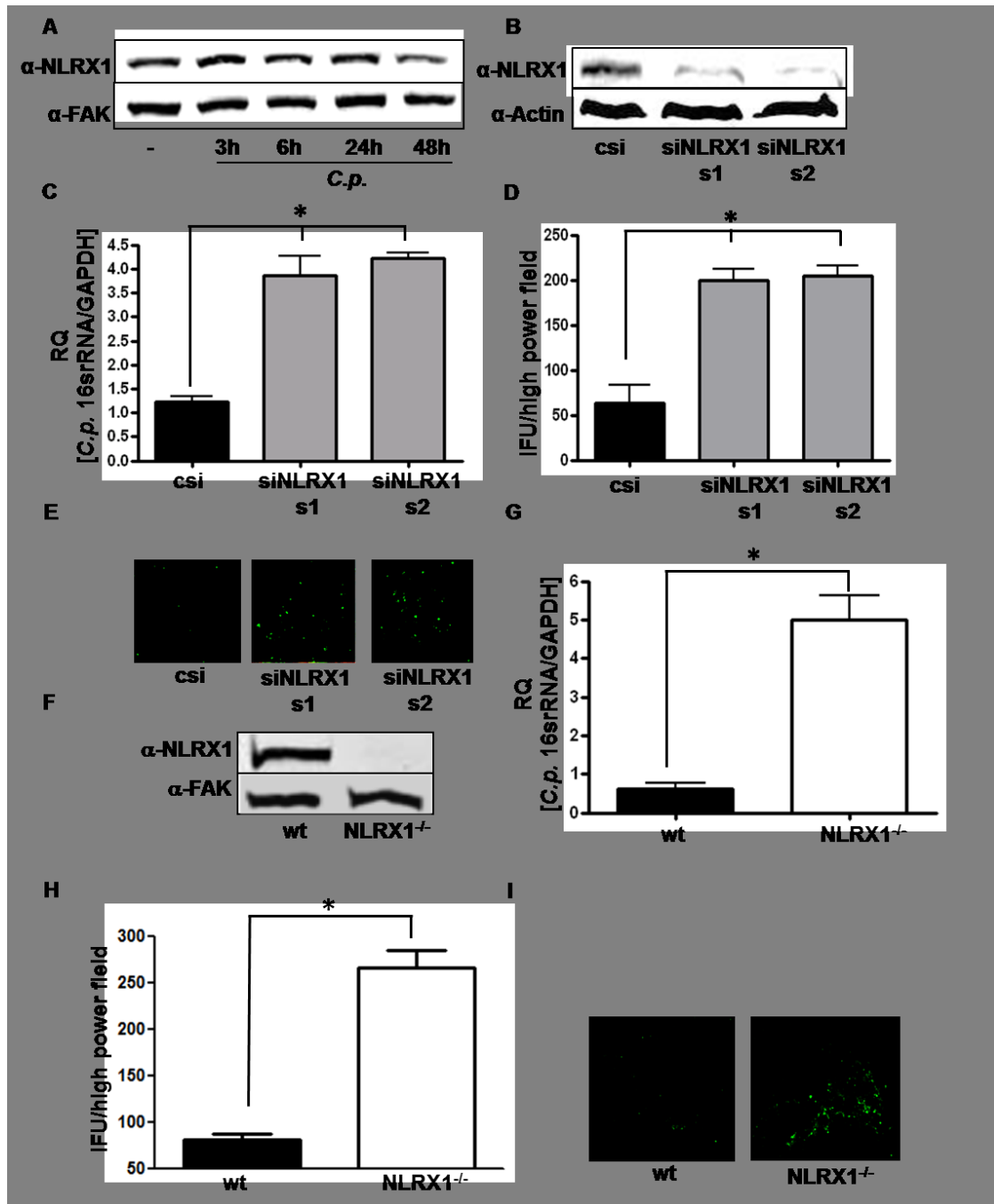


Abb. 11: Konstitutiv exprimiertes NLRX1 inhibiert die Replikation von *C. pneumoniae* in HUVEC und in BMM. [A] HUVEC wurden mit *C. pneumoniae* (MOI 3) über verschiedene Zeitintervalle infiziert. Anschließend wurde im Immunoblot die Expression von NLRX1 untersucht. [B, C, D und E] HUVEC wurden mit Kontroll-siRNA (csi), bzw. mit zwei verschiedenen siRNA-Sequenzen gegen NLRX1 (s1: Sequenz 1, s2: Sequenz 2) transfiziert und nach 72 h für 24 h mit *C. pneumoniae* (MOI 3) infiziert. Anschließend wurde im Immunoblot die Expression von NLRX1 [B] sowie mittels qRT-PCR [C] und im Konfokalmikroskop [D, E] die chlamydiale Vermehrung untersucht (Auszählung der *C. pneumoniae*-Inklusionen, Vergrößerung

x 640). Zur Bestimmung wurden jeweils pro well 30 Gesichtsfelder ausgezählt. [F, G] Wildtyp- und NLRX1^{-/-}-BMM wurden mit *C. pneumoniae* (MOI 3) infiziert. Es wurde ein Immunoblot mit einem NLRX1-spezifischen Antikörper durchgeführt [F] und mittels qRT-PCR die bakteriellen Nukleinsäuren quantifiziert [G]. [H, I] In einem Reinfektions-Experiment wurden HEp-2-Zellen mit Zellüberständen aus den Wildtyp, bzw. NLRX1-defizienten, mit *C. pneumoniae* infizierten Zellen für 24 h inkubiert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Auszählung der *C. pneumoniae*-Inklusionen, Vergrößerung x 640). Die dargestellten Ergebnisse aus den Abbildungen C, D, G und H stellen die Mittelwerte und deren Standardabweichungen von drei, voneinander unabhängigen Experimenten dar. Die Ergebnisse der qRT-PCR [C und G] zeigen die Mittelwerte und deren Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten normalisiert auf die GAPDH mRNA. Die in A, B, E, F und I dargestellten Ergebnisse sind jeweils repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente. Signifikante Unterschiede sind dargestellt mit * (= p < 0,05).

Im Immunoblot zeigte sich eine konstitutive Expression von NLRX1 in diesen Zellen, welche nicht durch die bakterielle Infektion verändert wurde (Abb. 11A). Des Weiteren sollte in „Loss of function“-Experimenten mit Hilfe von siRNA die Bedeutung von NLRX1 auf die Vermehrung von *C. pneumoniae* im Endothel untersucht werden. Zuerst wurde im Immunoblot nachgewiesen, dass die zwei eingesetzten NLRX1-spezifischen siRNA-Sequenzen eine deutliche Reduktion der NLRX1-Proteinexpression bewirkten (Abb. 11B). In der qRT-PCR basierten Quantifizierung der chlamydialen RNA sowie in der Auszählung der chlamydialen Einschlußkörper in Reinfektionsexperimenten in HEp-2-Zellen zeigte sich, dass die Menge der Chlamydien-RNA (Abb. 11C) und die Zahl der Chlamydien-Einschlusskörper (Abb. 11D, E) in siNLRX1-transfizierten-HUVEC erhöht war im Vergleich zu csiRNA-transfizierten Zellen. Um diese Ergebnisse zu bestätigen und auf andere Zellarten zu erweitern wurden außerdem NLRX1-defiziente murine Knochenmarksmakrophagen verwendet. Im Immunoblot, unter Verwendung eines NLRX1-spezifischen Antikörpers, zeigte sich, dass in den NLRX1-defizienten Mausmakrophagen tatsächlich kein NLRX1 exprimiert war und dass der verwendete Antikörper spezifisch NLRX1 detektierte (Abb. 11F). Die Quantifizierung chlamydialer RNA ergab eine ca. 5-6-fach erhöhte Menge in den NLRX1-defizienten Mausmakrophagen im Vergleich zu den Wildtypzellen (Abb. 11G). Auch Reinfektionsexperimente in HEp-2-Zellen zeigten nach Auszählung der Chlamydien-Einschlusskörper eine erhöhte Chlamydien-Anzahl in NLRX1-defizienten Mausmakrophagen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen (Abb. 11H, I).

2.7. NLRX1 hat keinen Einfluss auf die Produktion von Typ I-IFN und proinflammatorischen Zytokinen in *C. pneumoniae* infizierten Zellen

Wie oben dargestellt scheinen Typ I-IFN einen zellautonomen Abwehrmechanismus gegen *C. pneumoniae* in Endothelzellen zu aktivieren (Abb. 10). Außerdem hemmt NLRX1 die Vermehrung von *C. pneumoniae* in primären Endothelzellen und murinen Makrophagen (Abb. 11) und NLRX1 wurde mit der Regulation von Typ I-IFN in Verbindung gebracht (Moore et al., 2008; Moore et al., 2013; Lei et al., 2012; Lei et al., 2013). Es sollte deshalb zunächst geklärt werden, ob NLRX1 über die Regulation der Typ I-IFN-Antwort antichlamydial wirkt. Hierfür wurde die IFN β -mRNA-Expression nach Infektion mit *C. pneumoniae* in siRNA-behandelten HUVEC sowie in wt und NLRX1^{-/-}-BMM untersucht.

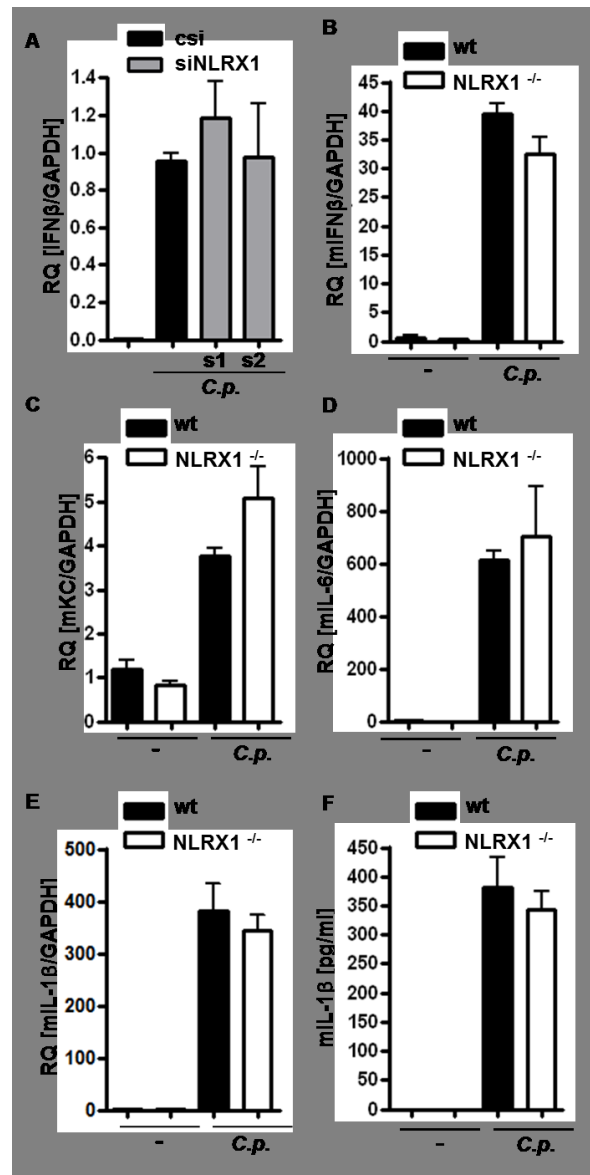


Abb. 12: Einfluss von NLRX1 auf die Expression von IFN β , mIFN β , mIL-1, mIL-6 und mKC. [A] HUVEC wurden mit Kontroll-siRNA (csi) oder mit zwei verschiedenen Sequenzen siRNA gegen NLRX1 (s1, s2) transfiziert und für 24 h mit *C. pneumoniae* (MOI 3) infiziert. Anschließend wurde die IFN β -mRNA-Expression mittels qRT-PCR untersucht. [B, C, D, E und F] Wt und NLRX1^{-/-}-BMM wurden mit *C. pneumoniae* (MOI 3) für 24 h infiziert und anschließend mit Hilfe der qRT-PCR auf die Expression von mIFN β [B], mKC [C], mIL-6 [D] und mIL-1 hin untersucht [E]. [F] Wt und NLRX1^{-/-}-BMM wurden mit *C. pneumoniae* (MOI 3) für 24 h infiziert, anschließend wurde die Menge des gebildeten mIL-1 β im Überstand mit Hilfe eines ELISA bestimmt. Die Ergebnisse in den Abbildungen A-F stellen die Mittelwerte und deren Standardabweichungen von drei, voneinander unabhängigen Experimenten dar. Die Ergebnisse der qRT-PCR in A-E zeigen die Mittelwerte und deren Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten normalisiert auf die GAPDH mRNA.

Die Abbildung 12A zeigt an, dass NLRX1 keinen Einfluss auf die INF β -Produktion in *C. pneumoniae*-infizierten HUVEC und BMM hat (Abb. 12A, B). Weiterführende Experimente zeigten zudem, dass NLRX1 auch auf die Induktion der proinflammatorischen Mediatoren KC und IL-6 sowie die Produktion des Inflammasom-abhängigen IL-1 β in *C. pneumoniae*-infizierten Makrophagen keinen Einfluss hatte (Abb. 12C-F).

2.8. *C. pneumoniae* induziert die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale unabhängig vom Mitochondrium

In kürzlich publizierten Arbeiten wurden Ergebnisse gezeigt, die andeuten, dass NLRX1 die Produktion von ROS reguliert (Tattoli et al., 2008). Aufbauend darauf sollte im Folgenden die Hypothese getestet werden, dass NLRX1 die ROS-Produktion in *C. pneumoniae*-infizierten Zellen reguliert und dass ROS für die zellautonome Abwehr gegen *C. pneumoniae* verantwortlich ist. Hierfür wurde mit Hilfe unterschiedlicher Methoden die Bildung der gesamten ROS-Produktion sowie des mitochondrialen ROS in Endothelzellen nach Infektion mit *C. pneumoniae* bestimmt. Außerdem wurden spezifische Inhibitoren der ROS-Produktion eingesetzt. Bei Mito-TEMPO handelt es sich um einen Inhibitor der ROS-Bildung mit einer „scavenger“-Funktion für mitochondrial gebildete Sauerstoffradikale (Dikalov & Nazarewicz, 2012). Ein weiterer verwendeter ROS-Inhibitor ist Necrox-5. Dieser Inhibitor verfügt ebenfalls über antioxidative Aktivität, hauptsächlich über die Blockade mitochondrial gebildeter, zelltodauslösender Sauerstoffradikale (Kim et al., 2010). Als Kontrolle diente die Induktion mitochondrialer Sauerstoffradikale durch Rotenone (Li et al., 2003).

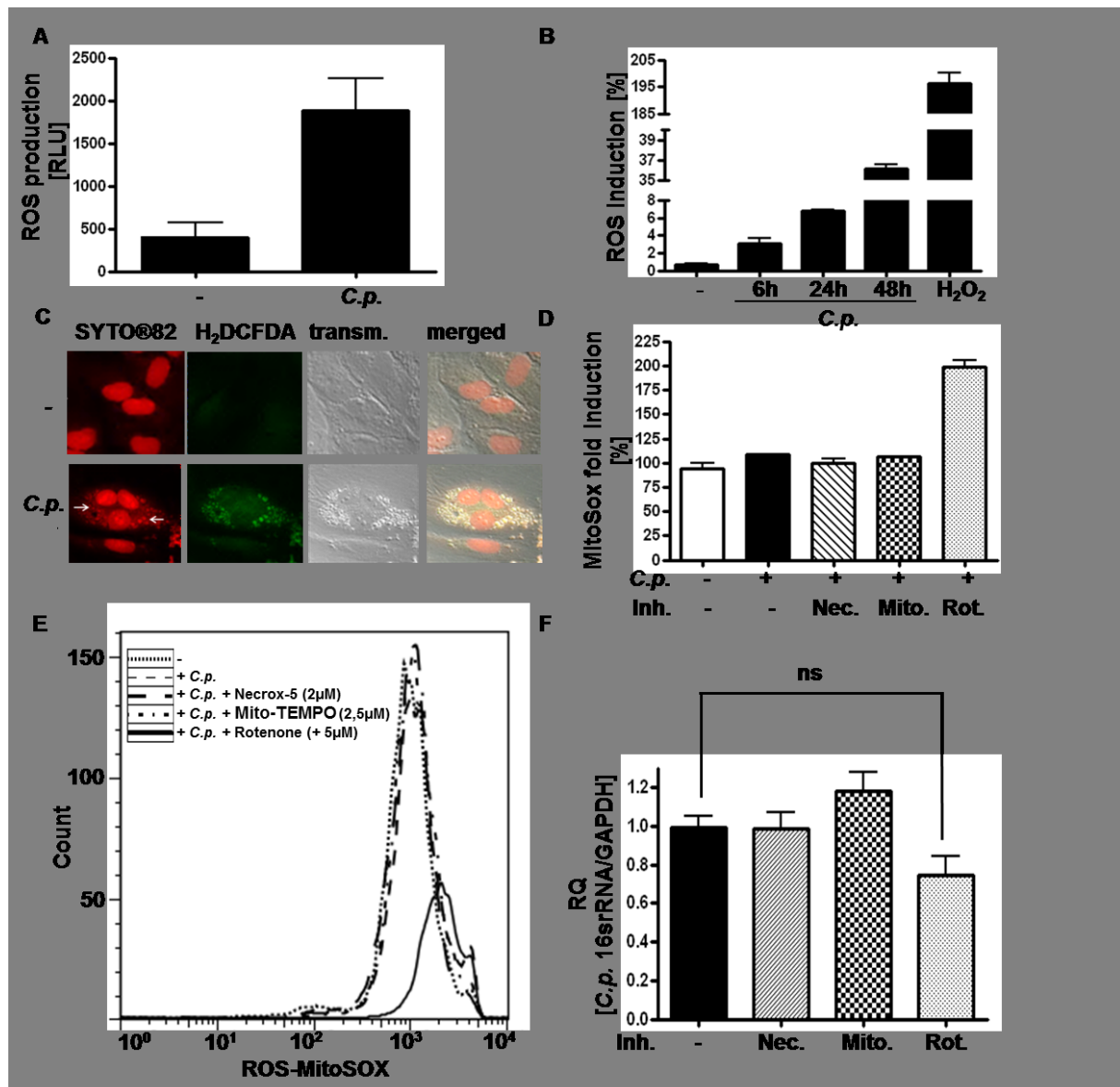


Abb. 13: ROS-Induktion nach *C. pneumoniae*-Infektion. [A] HUVEC wurden 24 h mit *C.p.* infiziert (MOI 3). Anschließend erfolgte der Nachweis der gesamten ROS-Produktion mit Hilfe von Chemilumineszenz im Luminometer (Einheit RLU= relative light units). [B] HUVEC wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit *C.p.* infiziert. Eine anschließende intrazelluläre ROS-Bestimmung erfolgte mittels durchflusszytometrischer Fluoreszenzmessung (H₂-DCFDA). Für den Kontrollwert wurde vor der Messung mit H₂O₂ (12,5 μM) stimuliert. [C] Es erfolgte ein mikroskopischer Nachweis der Induktion intrazellulärer ROS mit Hilfe des Farbstoffes H₂-DCFDA in lebenden HUVEC. Eine Nukleinsäurefärbung in lebenden HUVEC erfolgte mit SYTO82® (rot, weiße Pfeile: Chlamydien-DNA). [D, E] HUVEC wurden mit verschiedenen Inhibitoren/Induktoren inkubiert (Necrox-5: 2 μM; Mito-TEMPO: 2,5 μM; Rotenone: 5 μM) und anschließend mit *C. pneumoniae* (MOI 3, 24 h) infiziert. Die Bildung von mitochondrialem ROS

wurde mit Hilfe eines Superoxid-Indikatorfarbstoffes (Mito-SOX™) durchflußzytometrisch bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse des Histogramms in E sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. [F] Es wurde die Vermehrung von *C. pneumoniae* in den behandelten HUVEC mit Hilfe der qRT-PCR untersucht. Die Ergebnisse in den Abbildungen A, B, D und F stellen die Mittelwerte und deren Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten dar. Die Daten der qRT-PCR [F] zeigen die Mittelwerte und deren Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten normalisiert auf die GAPDH-mRNA. ns = nicht signifikant.

Mit Hilfe von drei verschiedenen Methoden, konnte gezeigt werden, dass *C. pneumoniae* in der Lage ist, die Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen in humanen Endothelzellen zu induzieren (Abb. 13A-C). Mitochondriales ROS hingegen wird in den mit *C. pneumoniae* infizierten Endothelzellen nicht induziert (Abb. 13D, E). Inhibitoren der mitochondrialen ROS-Produktion hatten keinen Einfluss auf die ROS-Produktion (Abb. 13D). Die Zugabe von Rotenone bewirkte eine ungefähre Verdopplung der mitochondrialen ROS-Produktion (Abb. 13D, E). Die Inhibitoren sowie der Aktivator der mitochondrialen ROS-Produktion wirkten sich ebenfalls nicht signifikant auf die Bakterienlast in HUVEC aus (Abb. 13F).

Nach derzeitigem Kenntnisstand sind die wichtigsten Enzyme, welche neben denen der Atmungskette im pulmonal-vaskulären System ROS produzieren, Xanthin-Oxidasen, Lipoxygenasen, NO-Synthasen und die NADPH-Oxidasen (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidasen, NOX) (Dikalov et al., 2007; Clempus et al., 2006; Tsusui et al., 2004). Einige Arbeiten postulieren, dass die vaskuläre ROS-Produktion hauptsächlich auf die Aktivität der NADPH-Oxidasen zurückzuführen ist (Touyz et al., 2004; Griendling et al., 2000; Lassegue et al., 2003). NADPH-Oxidasen katalysieren eine Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Superoxid. Dieses wiederum kann durch Oxidation von Proteinen, DNA und Kohlenhydraten eine direkte bakterizide Wirkung haben (Lambeth et al., 2004; Segal et al., 1996).

Um die Bedeutung der NADPH-Oxidasen für die ROS-Produktion und Chlamydieninfektion in humanen Endothelzellen genauer zu untersuchen, wurde ein spezifischer Inhibitor verwendet. DPI (Diphenyleniodiumchlorid) ist ein kompetitiver Inhibitor Flavin-beihaltender Ko-Faktoren und damit ein potenter Inhibitor NOX-abhängiger ROS-Produktion (Hancock et al., 1987).

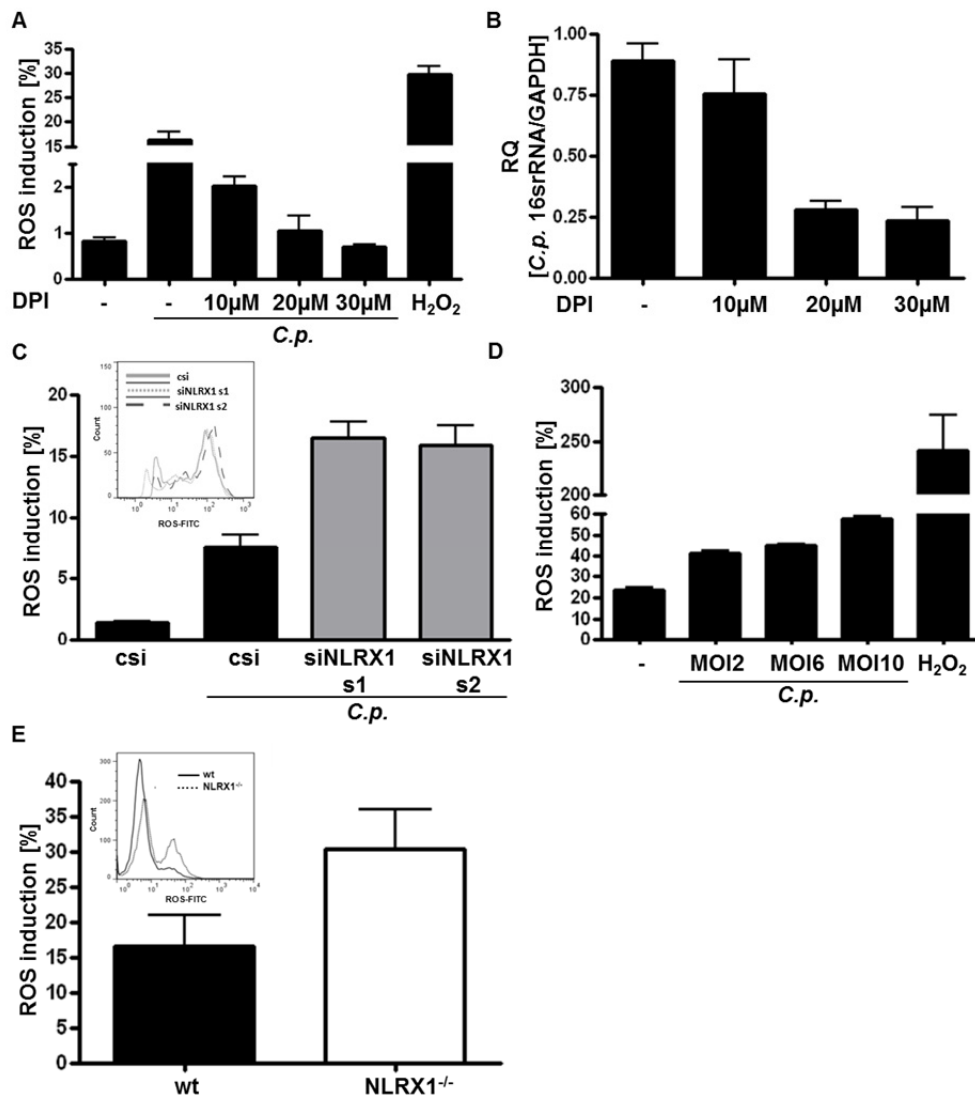


Abb. 14: Die ROS-Produktion in mit *C. pneumoniae* infizierten Wirtszellen ist abhängig von NADPH-Oxidasen und unabhängig von NLRX1. [A] HUVEC wurden 30 min vor der Infektion mit *C. pneumoniae* mit verschiedenen Konzentrationen DPI inkubiert und anschließend mittels H₂-DCFDA durchflusszytometrisch auf die Bildung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffradikale untersucht. Für den Kontrollwert wurden 12,5 μ M H₂O₂ eingesetzt. [B] Die Vermehrung von *C. pneumoniae* in den mit DPI behandelten HUVEC wurde mit Hilfe der qRT-PCR untersucht. [C] HUVEC wurden mit Kontroll-siRNA (csi), bzw. mit zwei verschiedenen Sequenzen siRNA gegen NLRX1 (s1, s2) transfiziert und für 24 h mit *C. pneumoniae* (MOI 3) infiziert. Anschließend wurde durchflusszytometrisch die Bildung intrazellulärer reaktiver

Sauerstoffradikale bestimmt. [D] Die ROS-Induktion wurde durchflusszytometrisch in murinen Knochenmarksmakrophagen (wt) bestimmt, welche zuvor 24 h mit verschiedenen Konzentrationen *C.p.* infiziert wurden. [E] Es erfolgte eine ROS-Bestimmung mittels Durchflusszytometrie in NLRX1-defizienten murinen Knochenmarksmakrophagen nach Infektion mit *C. pneumoniae* im Vergleich zu Wildtyp-Zellen. Die dargestellten Ergebnisse der Histogramme in C und E sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Die Ergebnisse aus den Abbildungen A, C, D und E zeigen die Mittelwerte und deren Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse der qRT-PCR in B repräsentieren die Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten normalisiert auf die GAPDH mRNA.

Die Zugabe von DPI bewirkte eine dosisabhängige Reduktion der ROS-Produktion in mit *C. pneumoniae* infizierten Endothelzellen (Abb. 14A). Interessanterweise führte die Hemmung der ROS-Produktion durch DPI auch zu einer Reduktion der Bakterienlast in den Endothelzellen, gemessen an der relativen Menge an Chlamydien-RNA (Abb. 14B). Die Hemmung von NLRX1 mittels siRNA hatte keinen Einfluss auf die Produktion von ROS in HUVEC (Abb. 14C). Darüber hinaus produzierten auch *C. pneumoniae*-infizierte Makrophagen ROS (Abb. 14D) und diese ROS-Produktion war unabhängig von NLRX1 (Abb. 14E).

2.9. Einfluss des Inflammasom-Adpatermoleküls ASC auf die Vermehrung von *C. pneumoniae*

Eine kürzlich publizierte Studie deutet an, dass in *Chlamydia trachomatis*-infizierten Epithelzellen ROS abhängig von NLRX1 und NADPH-Oxidasen gebildet wird und nachfolgend über die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms wachstumsfördernd auf die Chlamydien wirkt (Abdul-Sater et al., 2010). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse über den hemmenden Einfluss von NLRX1 (Abb. 11 C, D, E, G, H und I) auf die Infektion mit *C. pneumoniae* und die intakte IL-1 β -Produktion in NLRX1^{-/-} BMM (Abb. 12 E und F) geben bereits deutliche Hinweise auf andersartige Wirkmechanismen in *C. pneumoniae*-infizierten Endothelzellen und Makrophagen. Um jedoch auch direkt den Einfluss des Inflammasoms auf die Vermehrung von *C. pneumoniae* in Endothelzellen und Makrophagen zu untersuchen, wurde das kritische Inflammasom-Adaptermolekül ASC mit siRNAs gehemmt, sowie ASC^{-/-} BMM eingesetzt.

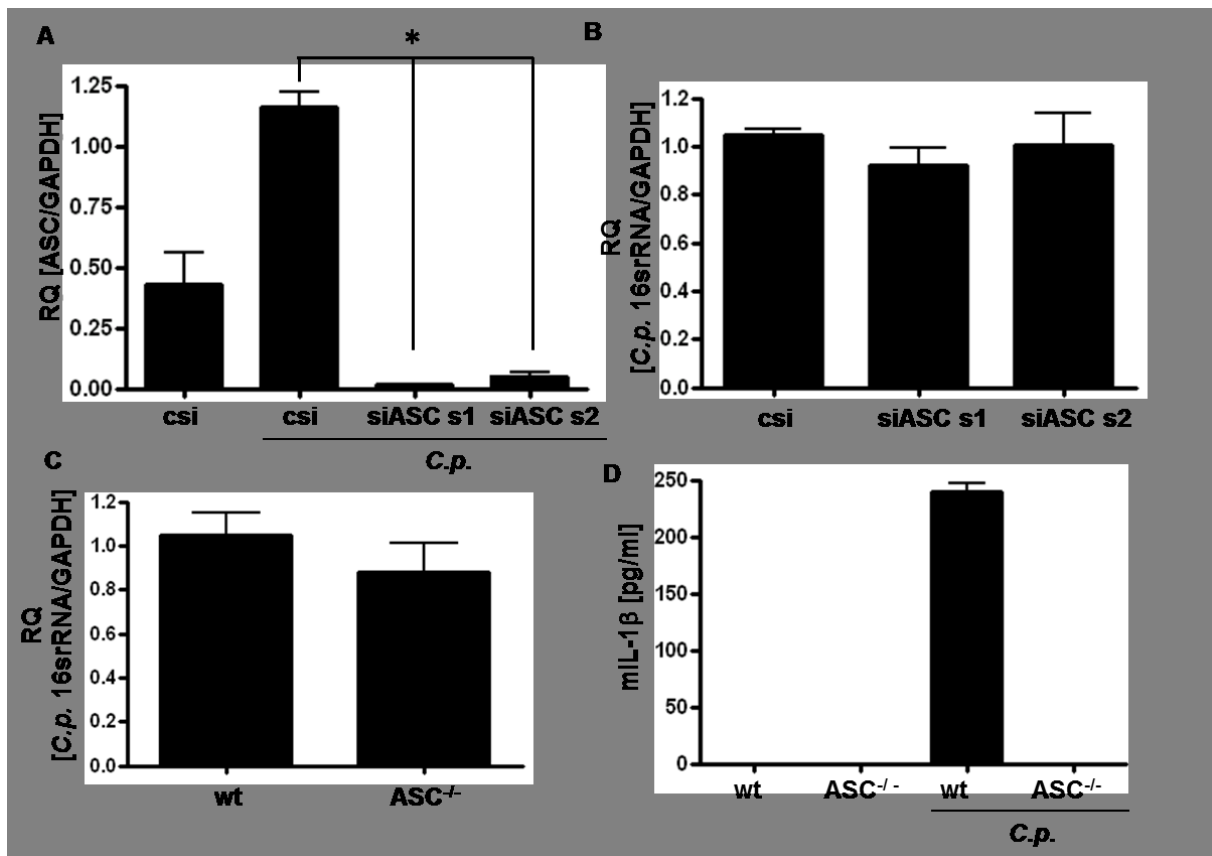


Abb. 13: Einfluss des Adaptermoleküls ASC auf die Replikation von *C. pneumoniae*. [A, B] HUVEC wurden mit Kontroll-siRNA (csi), bzw. mit zwei verschiedenen Sequenzen siRNA gegen ASC (s1, s2) transfiziert und für 24 h mit *C. pneumoniae* (MOI 3) infiziert. Die Transfektionseffizienz [A] und die chlamydiale Vermehrung [B, C] wurden mit Hilfe der qRT-CR untersucht. [C] Die Vermehrung von *C.p.* wurde in murinen ASC^{-/-}-Knochenmarksmakrophagen im Vergleich zu Wildtyp-Knochenmarksmakrophagen (wt) nach 24 h Infektion (MOI 3) mit Hilfe der q-RT-PCR untersucht. [D] Zellüberstände muriner Knochenmarksmakrophagen wurden 24 h nach Infektion mit *C. pneumoniae* (MOI 3) in einem ELISA auf die Bildung von IL-1β hin untersucht. Die Ergebnisse in A-D stellen die Mittelwerte und deren Standardabweichungen aus drei, voneinander unabhängigen Experimenten dar. Die Ergebnisse der qRT-PCR in A-C zeigen die Mittelwerte und deren Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten normalisiert auf die GAPDH-mRNA. Signifikante Unterschiede sind dargestellt mit * (= $p < 0,05$).

Mit Hilfe der Nukleofektion konnte in Endothelzellen eine Hemmung der ASC-mRNA mit Hilfe der ASC-spezifischen siRNA von annähernd 100 % erreicht werden. Die Quantifizierung der Chlamydien-RNA mittels PCR in den mit siASC transfizierten humanen Endothelzellen und in den ASC-defizienten Mausmakrophagen zeigte keinerlei Veränderungen im Vergleich zu csi-transfizierten Zellen, bzw. zu Wildtypzellen. Weiterhin zeigte sich eine vollständige Reduktion

der IL-1 β -Sekretion in ASC-defizienten murinen Knochenmarksmakrophagen im Vergleich zu Wildtypzellen [Abb. 13 D]. Das Inflammasom-Adapter-Molekül ASC scheint somit keinen Einfluss auf die *C. pneumoniae* Infektion in humanen Endothelzellen und in murinen Makrophagen zu haben, obschon es an der Induktion von IL-1 in letzteren essentiell beteiligt zu sein scheint.

2.10. Einfluss der Autophagie auf die Replikation von *C. pneumoniae*

Erst kürzlich konnte neben dem Adapterprotein MAVS ein weiterer direkter mitochondrialer Interaktionspartner von NLRX1 identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um TUFM das wiederum mit den Autophagie-Proteinen ATG12, ATG5 und ATG16L1 interagiert und diese positiv reguliert (Lei et al., 2012; Lei et al., 2013). Da autophagische Prozesse einen autonomen Abwehrmechanismus der Zelle gegen intrazelluläre Bakterien darstellen, sollte nun eine mögliche Bedeutung der Autophagie nach Infektion von Endothelzellen mit *C. pneumoniae* untersucht werden. Hierfür wurde die für die Autophagie essenentielle Ubiquitin-Ligase ATG5, mittels siRNA in HUVEC gehemmt.

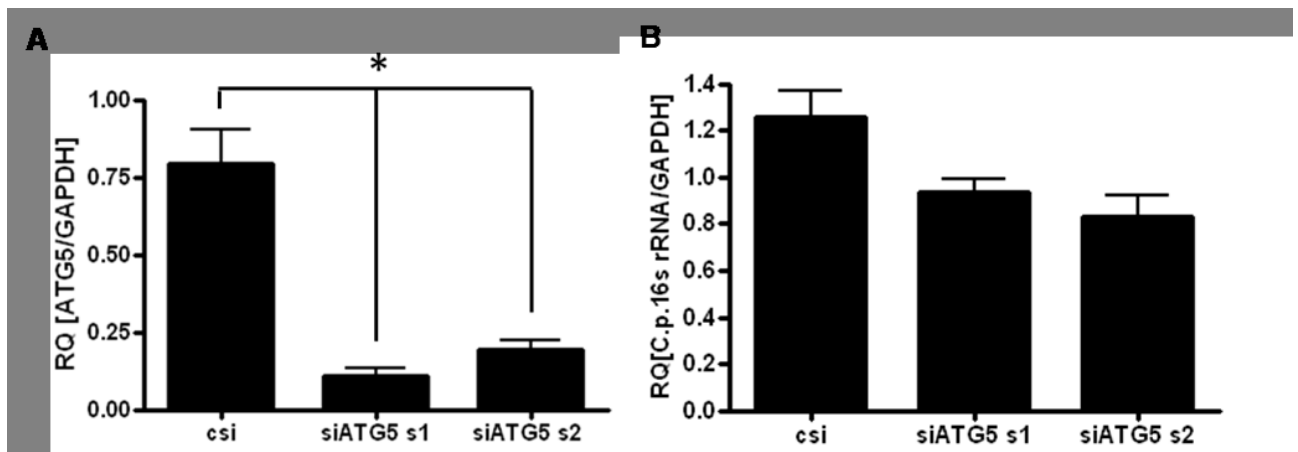


Abb. 14: Regulation der Autophagie durch NLRX1. [A, B] HUVEC wurden mit csiRNA, bzw. mit zwei verschiedenen Sequenzen siRNA gegen ATG5 (s1, s2) transfiziert und für 24 h mit *C. pneumoniae* (MOI 3) infiziert. Die Transfektionseffizienz [A] und die chlamydiale Vermehrung [B] wurden mit Hilfe der quantitativen PCR untersucht. Die Daten der quantitativen PCR zeigen die Mittelwerte und deren Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten normalisiert auf die GAPDH mRNA. Signifikante Unterschiede sind dargestellt mit * ($p < 0,05$).

In den Experimenten konnte eine Transfektionseffizienz von bis zu 90 % erreicht werden (Abb. 14A). Die Menge der chlamydialen DNA zeigte sich in den mit siATG5 transfizierten HUVEC im Vergleich zu csi-transfizierten Zellen nahezu unverändert (Abb. 14B). Die Autophagie scheint demnach keinen Einfluß auf die intrazelluläre Replikation von *C. pneumoniae* in Endothelzellen zu haben.

3. Diskussion

Typ I-IFN spielen eine essentielle Rolle bei der Abwehr von Virusinfektionen. Die daran beteiligten Faktoren der Erkennung und Signalweiterleitung sind einigermaßen gut bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Typ I-IFN auch in bakteriellen Infektionen eine wichtige Rolle spielen. Es zeigte sich hierbei sowohl eine schädliche als auch eine wirtszellprotektive Wirkweise der Typ I-IFN (Auerbuch et al., 2004; Bouchonnet et al., 2002; Carrero et al., 2004; Manca et al., 2001; O'Connell et al., 2004; Stockinger et al., 2002; Hess et al., 1989; Opitz et al., 2006; Mancuso et al., 2007; Lippmann et al., 2011). Die erste Beobachtung einer Wirtszellprotektion durch Typ I-IFN während einer Infektion mit intrazellulären Bakterien wurde bereits 1985 mit Pathogenen der Gattung *Chlamydia* gemacht (de la Maza et al., 1985). In dieser Studie inhibierten Typ I-IFN das Wachstum von *C. trachomatis* in Hela-Zellen zum Zeitpunkt der Transformation vom EB zur Teilungsform, dem RB (de la Maza et al., 1985). In weiteren Studien zeigte sich eine signifikant erhöhte Bakterienlast von *C. pneumoniae* in IFN β -defizienten murinen Knochenmarksmakrophagen im Vergleich zu Wildtypzellen (Trumstedt et al., 2007). Auch das Signalmolekül STAT1 scheint kooperative Effekte abhängig von IFN α/β und IFN γ zu vermitteln, welche sich beide wirtsprotektiv in der Infektion mit *C. pneumoniae* auswirken (Rothfuchs et al., 2006). Die zugrundeliegenden Wirkweisen von Typ I-IFN in bakteriellen Infektionen sind jedoch nach wie vor weitestgehend unbekannt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass IFN β bei der intrazellulären Infektion des Endothels mit *C. pneumoniae* eine replikationsinhibierende Wirkung ausübt. Dieser intrazelluläre Resistenzmechanismus der Wirtszelle ist abhängig von der Erkennung der Chlamydien durch einen noch unbekannten zytosolischen PRR, dem Adaptermolekül MAVS sowie den Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sowohl endogen produziertes Typ I-IFN, als auch exogen hinzugefügtes IFN β die Chlamydien-Replikation in Endothelzellen hemmt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Bedeutung des erst kürzlich identifizierten NOD-like-Rezeptors NLRX1 bei der Infektion humaner Endothelzellen und muriner Knochenmarksmakrophagen mit *Chlamydomydia pneumoniae* untersucht. Da NLRX1 als Regulator der MAVS-abhängigen Typ I-IFN-Produktion beschrieben wurde (Moore et al., 2008; Moore et al., 2011; Allen et al., 2011; Lei et al., 2012; Lei et al., 2013) lag der Fokus zunächst auf einer möglichen Beeinflussung der Typ I-IFN-abhängigen intrazellulären Bakterienabwehr durch NLRX1. Obwohl die genauen Mechanismen der antichlamydialen Aktivität von NLRX1

offen bleiben, zeigen die hier dargestellten Ergebnisse, dass NLRX1 unabhängig von den Typ I IFN, von der Induktion weiterer proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, KC und IL-1, von der Induktion reaktiver Sauerstoffradikale, und auch unabhängig von Autophagie- und Inflammasomaktivierung zu wirken scheint.

3.1. Aktivierung des MAVS-IRF-IFN β -Signalweges durch *Chlamydomonas pneumoniae*

Wirtszellen sind in der Lage, extra- und intrazelluläre Bakterien mittels verschiedenartiger PRRs zu erkennen und nachfolgend Typ I-IFN zu produzieren. Bislang konnten in verschiedenen bakteriellen Infektionen unterschiedliche Typ I-IFN-produzierende Zelltypen identifiziert werden. So produzieren sowohl Makrophagen und DCs, als auch Epithelzellen und B-Zellen, Typ I-IFN als Antwort auf eine bakterielle Infektion (Gratz et al., 2011; Mancuso et al., 2009; Opitz et al., 2006). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen erstmals eine dosisabhängige Induktion von IFN β in primären humanen Endothelzellen nach Infektion mit *Chlamydomonas pneumoniae*. Diese Produktion von IFN β hängt von der aktiven Aufnahme lebender Bakterien ab, da eine Stimulation mit hitzeinaktivierten Chlamydien zu keiner signifikanten IFN β -Antwort führt (Abb. 6A, B). Auch vorangegangene Studien bestätigen die Notwendigkeit einer „aktiven“ Infektion von Endothelzellen mit *C. pneumoniae* sowohl für die Adhäsionsmolekülexpression (Krüll et al., 2004, Klucken, 2008), als auch für die proinflammatorische Aktivierung (Krüll et al., 2004, Klucken, 2008). Offenbar ist also die intrazelluläre Infektion mit lebenden Chlamydien nötig, um eine prolongierte Zielzellaktivierung und die damit verbundene Induktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IFN β zu induzieren.

Die Induktion einer Typ I-IFN-Antwort nach einer Virusinfektion erfordert die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 (Sato et al., 2000). Die Infektion von primären Endothelzellen mit *C. pneumoniae* führt sowohl zu einer Translokation von IRF3 und IRF7, als auch zu einer Translokation der NF- κ B-Untereinheit p65 in den Zellkern (Abb. 7A, B). Eine Translokation von IRF3 konnte bereits nach 1 h nachgewiesen werden, wohingegen IRF7 erst nach 3 bis 6 h vollständig im Zellkern detektiert werden konnte (Abb. 7A, 8B). Zu diesem Zeitpunkt begann auch die Expression von IFN β stark anzusteigen (Abb. 6B). IRF7 scheint also, ähnlich wie bei einer Virusinfektion, auch nach Infektion mit Chlamydien eine Funktion bei der Verstärkung der IFN β -Expression über einen positiven Rückkopplungsmechanismus zu haben (Sato et al., 1998). Hierbei kommt es zu einer Induktion des basal schwach exprimierten IRF7

durch eine IFN β -vermittelte Aktivierung des Transkriptionsaktivators ISGF3 (Levy et al., 1989). Nach Induktion und anschließender Aktivierung binden sowohl IRF3 als auch IRF7 und NF- κ B an den IFN β -Promotor (Abb. 7D, 8D) und führen zu einer Expression von IFN β . Nachfolgende Studien mit *Listeria monocytogenes* zeigen ebenfalls eine Beteiligung von IRF3 und IRF7 an der IFN β -Induktion (Aubry et al., 2012).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass in humanen Endothelzellen nach Infektion mit Chlamydien ähnliche Signalwege die IFN β -Induktion vermitteln wie in viralen Infektionen.

3.2. Beteiligung intrazellulärer Rezeptoren an der MAVS-IRF-vermittelten IFN β -Induktion

Mit *C. pneumoniae* infizierte Endothelzellen produzieren IFN β abhängig vom Adaptermolekül MAVS (Abb. 9). MAVS ist ein wichtiges Adaptermolekül, das die zytosolischen PRRs RIG-I und MDA5 bindet und die intrazellulären Signalkaskaden unterhalb dieser PRRs aktiviert. So aktivieren RIG-I und MDA5 abhängig von MAVS Typ I-IFN-Antworten sowie die Expression von NF- κ B-regulierten proinflammatorischen Mediatoren. RIG-I und MDA5 sind vor allem als Rezeptoren viraler RNA bekannt. Hierbei erkennt RIG-I sowohl einzelsträngige RNA-Sequenzen mit einem Triphosphat am 5'-Ende (Hornung et al., 2006), als auch kurze doppelsträngige RNA mit 21 bis 27 Nukleotiden (Pichlmair et al., 2006; Kato et al., 2008). MDA5 hingegen ist für die Erkennung längerer dsRNA-Fragmente (> 2 kb) verantwortlich (Kato et al., 2006; Kato et al., 2008). Bislang ist wenig darüber bekannt, ob bakterielle Nukleinsäuren ebenfalls durch RIG-I und/oder MDA5 detektiert werden können.

Eine Studie aus dem Jahre 2009 beschreibt eine RIG-I-abhängige Typ I-IFN Induktion mit *L. pneumophila*-infizierten Mausemakrophagen (Monroe et al., 2009). Nach Abdullah et al., induziert eine Infektion mit Listerien mittels einer aktiven Sekretion von RNA in das Wirtszellzytosol ebenfalls eine RIG-I-abhängige IFN β -Antwort (Abdullah et al., 2012). Auch RNA aus kommensalisch lebenden Darmbakterien scheinen über eine Bindung an RIG-I eine MAVS-abhängige Typ I-IFN-Antwort auszulösen (Li et al., 2011). Durch „Loss of function“-Experimente, z. B. mit Hilfe von RNAi könnten zukünftig weitere Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von RIG-I an der chlamydialen Erkennung in Endothelzellen gefunden werden.

Die RNA Polymerase III ist in der Lage zytosolische DNA zu erkennen und nachfolgend den RIG-I/IFN β -Signalweg zu induzieren. Die Polymerase transkribiert AT-reiche DNA-Strukturen im Wirtszellzytosol in eine durch RIG-I detektierbare Form (5'-ppp-RNA) (Chiu et al., 2009). Zwei Studien identifizierten die RNA-Polymerase III als einen Detektor für virale und bakterielle DNA, welcher RIG-I und MAVS-vermittelt zur Induktion von IFN β führt (Ablasser et al., 2009; Chiu et al., 2010). Eine Beteiligung am Typ I-IFN-Signalweg konnte nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* und *Legionella pneumophila* beschrieben werden (Pollpeter et al., 2011; Chiu et al., 2010). In den hier dargestellten Ergebnissen hatte die Behandlung von Endothelzellen mit einem spezifischen Inhibitor der RNA-Polymerase III (ML-60218) keinen Einfluss auf die IFN β -Induktion nach Infektion mit *C. pneumoniae* (Abb. 10F). Eine Beteiligung der RNA-Polymerase III an der MAVS-vermittelten IFN β -Induktion nach einer Infektion mit *C. pneumoniae* ist demnach unwahrscheinlich. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Chiliveru et al., die zeigten, dass die Behandlung mit diesem Inhibitor der RNA-Polymerase III keine Auswirkungen auf die Induktion einer ISG-Expression nach Infektion mit *C. pneumoniae* hatte (Chiliveru et al., 2010).

Neben RNA könnte auch die Erkennung von chlamydialer DNA an der Typ I-IFN-Produktion in *C. pneumoniae*-infizierten Endothelzellen beteiligt sein. Insgesamt zeigen verschiedene Studien, dass bakterielle DNA nach Erkennung durch zytosolische PRRs die Produktion von IFN β aktivieren kann (Stetson and Medzhitov, 2006; Charrel-Dennis et al., 2008; Leber et al., 2008; Chiu et al., 2009). So zeigt beispielsweise eine Behandlung mit DNase eine Reduktion der IFN β -Produktion im Rahmen einer Infektion mit *Legionella pneumophila* und *Brucella abortus* (Lippmann et al., 2011, de Almeida et al., 2011). Weiterhin verfügen viele gram-negative Bakterien, wie z. B. *Legionella pneumophila* über ein Typ-IV-Sekretionssystem, das dazu in der Lage zu sein scheint, bakterielle DNA in das Wirtszellzytosol zu translozieren. Chlamydien nutzen für die Translokation von Effektorproteinen ins Wirtszellzytosol ein Typ-III-Sekretionssystem, das für den gesamten chlamydialen Entwicklungszyklus essentiell zu sein scheint (Muschiol et al., 2006). Bisher ist nicht bekannt, ob Chlamydien auch in der Lage sind, eigene DNA oder RNA in die Wirtszelle zu translozieren. Die Tatsache, dass nur lebende Chlamydien eine IFN β -Induktion in humanen Endothelzellen induzieren, ist jedoch ein Hinweis auf die Beteiligung eines aktiven Sekretionsprozesses.

Weitere PRRs, die eine Funktion in der *C. pneumoniae*-stimulierten Typ I-IFN-Produktion haben könnten, sind u. a. die zyklische GMP-AMP-Synthase (cGAS), DAI und IFI16 (Takaoka et al.,

2007; Unterholzner et al., 2010; Wu et al., 2013). Alle diese Rezeptoren sind abhängig vom Adaptermolekül STING. STING erkennt direkt zyklisches di-AMP und zyklisches di-GMP (Burdette et al., 2011). Zusätzlich scheint die Helikase DDX41 in der Lage zu sein, zyklisches di-GMP, bzw di-AMP im Wirtszellzytosol zu erkennen und über STING eine IRF/TBK-abhängige Typ I-IFN-Produktion zu vermitteln (Parvatiyar et al., 2012). Erst kürzlich konnte erstmals gezeigt werden, dass während der Infektion von murinen Lungenfibroblasten der Maus sowie humanen Epithelzellen mit *C. trachomatis* die Erkennung von zyklischem di-AMP, das durch eine bakterielle Diadenylatzyklase (*dacA*) gebildet wird, durch STING zu einer Typ I IFN-Antwort führt (Barker et al., 2013). Die genaue Funktion des von *C. trachomatis* exprimiertem zyklischen di-AMP ist bislang unbekannt. Es zeigte sich jedoch anhand von quantitativen Proteomstudien eine Expression von zyklischem di-AMP ausschließlich in EBs (15 h p.i) (Saka et al., 2011). Es handelt sich also um ein Molekül, das möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Erkennung von chlamydialen EBs durch Rezeptoren der angeborenen Immunantwort zu spielen scheint. Die Identifikation einer funktionsfähigen Diadenylatzyklase von *C. pneumoniae* könnte somit weiteren Aufschluss über die IFN-Induktion mittels einer STING-abhängigen Detektion von bakteriellem di-AMP ergeben.

Die Suche nach möglichen chlamydialen Virulenzfaktoren, die eine Rolle bei der MAVS-vermittelten Erkennung, bzw. Signalweiterleitung spielen könnten, gestaltet sich grundsätzlich schwierig. Chlamydien sind aufgrund ihres einzigartigen Wachstumszyklus nur schwer genetisch modifizierbar und ebenfalls nur schwer in großen Mengen anzüchtbar um dann gezielt daraus bestimmte Proteine oder weitere Oberflächenstrukturen zu isolieren (Kari et al., 2011). Das Genom von *C. pneumoniae* ist zwar seit 1999 vollständig sequenziert (1.23 x 10⁶ nt kodieren ca. 1052 Proteine, Gen-Bank Nr.: AE001363 (Stephens et al., 1999), nichtsdestotrotz sind die Mechanismen der Infektion und der Wirtszellaktivierung bis heute noch in vielen Bereichen ungeklärt.

Im ersten Teil dieser Arbeit, ist es gelungen, einen neuen Signalweg der intrazellulären Erkennung von *C. pneumoniae* in humanen Endothelzellen zu identifizieren. Zusammenfassend konnten folgende Erkenntnisse gewonnen werden: Nach einer Chlamydien-Infektion kommt es über einen noch unbekannten zytosolischen Rezeptor und dem mitochondrienassoziierten Adaptermolekül MAVS zu einer Aktivierung und Kerntranslokation von IRF3 und IRF7, was wiederum zur IFN β -Gentranskription mit anschließender Translation und zu einer IFN β -Sekretion führt. Zusätzlich wurde nach Chlamydieninfektion humaner Endothelzellen auch der

Transkriptionsfaktor NF- κ B (bzw. dessen Untereinheit p65) aktiviert, der ebenfalls an der IFN β -Expression beteiligt ist. Da dies jedoch nicht unmittelbar Gegenstand der vorliegenden Arbeit war, soll hier nicht näher darauf eingegangen werden.

3.3. Die MAVS-IRF-IFN β -vermittelte intrazelluläre Abwehr gegen *Chlamydomonas pneumoniae* im Endothel

Zur Abwehr intrazellulärer Pathogene haben Vertebraten im Laufe der Evolution verschiedene intrazelluläre Abwehrmechanismen entwickelt. Hierzu gehören unter anderem der intrazelluläre Abbau bakterieller Bestandteile durch endo-lysosomale Fusion (Mukherjee et al., 2002), die bakterizide Aktivität durch die Produktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoff-Radikale (Nathan und Shiloh, 2000), die Bildung antimikrobieller Peptide, wie z. B. LL-37 und HMG2 (Rosenberger et al., 2004; Feng et al., 2005), die Regulation der bakteriellen Nährstoffversorgung durch verschiedene zelluläre Faktoren wie dem Tryptophan-abbauenden Enzym IDO und dem Eisentransportprotein Nramp1 (engl.: „natural resistance-associated macrophage protein one“) sowie unterschiedlich ausgeprägte Formen des zellulären Selbstverdaus wie z. B. Autophagie, Pyroptose, Apoptose und Nekrose (Rich et al., 2003; Nakagawa et al., 2004; Bortoluci und Medzhitov, 2010). Darüber hinaus werden als Antwort auf eine bakterielle Infektion inflammatorische Zyto- und Chemokine von Makrophagen, dendritischen Zellen aber auch Epithel- und Endothelzellen gebildet. Die Typ I-IFN gehören zu den effektivsten Mediatoren bei der Abwehr intrazellulärer Pathogene (Sadler und Williams, 2008) und sind an der Regulation vieler intrazellulärer Abwehrmechanismen beteiligt. Viele hundert humane und murine IFN-stimulierte Gene (ISGs) wurden bislang identifiziert, die genaue Funktion der meisten ISGs ist jedoch noch unbekannt (Kumar et al., 2010; Schoggings et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Typ I-IFN eine wichtige Rolle bei der Abwehr einer *C. pneumoniae*-Infektion des Endothels spielen. Die Ergebnisse der RNAi-Experimente mit IRF3/IRF7- und MAVS-spezifischer siRNA zeigten ein erhöhtes Chlamydienwachstum im Vergleich zum Bakterienwachstum in Kontroll-siRNA transfizierten Zellen (Abb.10 A-C). Der MAVS-IRF3/IRF7-IFN β -Signalweg scheint demnach einen zellautonomen angeborenen intrazellulären Resistenzmechanismus gegenüber *C. pneumoniae* zu aktivieren. Studien mit *C. muridarum* zeigten eine protektive Rolle von IRF3, welche unabhängig von IFN β zu sein schien (Prantner et al., 2011). Der negative Effekt auf die

chlamydiale Replikation nach einer Vorbehandlung der Endothelzellen mit rhIFN β (Abb. 10 D, E) und eine signifikant erhöhte Replikation in IFNAR-defizienten Mausemakrophagen (Abb. 10E) deuten darauf hin, dass höchstwahrscheinlich autokrin produziertes Typ I-IFN antibakterielle Signalwege aktiviert. Der MAVS-IRF3/IRF7-IFN β -Signalweg scheint demnach einen zellautonomen angeborenen intrazellulären Resistenzmechanismus gegenüber *C. pneumoniae* zu aktivieren.

Chlamydien sind in der Lage, durch die Induktion von Typ I-IFN die Expression sogenannter ISGs auszulösen (Chiliveru et al., 2010). Somit kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die IFN β -abhängige Chlamydien-Restriktion über ein oder mehrere ISG(s) vermittelt wird.

Potentiell antibakteriell wirkende Proteine, die durch Typ I und II-IFN induziert werden können sind z. B. die sogenannten IRGs (engl.: „immunity related GTPases“), die auch als p47-GTPasen bezeichnet werden. In der Maus existieren 23 IRGs, von denen viele antibakteriell wirken (Bekpen et al., 2005; MacMicking et al., 2003; Martens et al., 2005; Taylor et al., 2004). Bisher konnte für die murinen IRGs Irga6 und Irgb10 beschrieben werden, dass sie einen hemmenden Einfluss auf die Chlamydieninfektion haben (Al-Zeer et al., 2009; Coers et al., 2008). Eine aktuelle Studie zeigt außerdem erstmals eine Beteiligung einer weiteren Familie humaner GTPasen an der Abwehr einer intrazellulären Bakterieninfektion. In dieser Studie vermittelt die Induktion von GBP1 und GBP2 IFN γ -abhängig die Restriktion von *C. trachomatis* über eine Induktion der Autophagie (Al-Zeer et al., 2013). Diese Studien beschränken sich zwar auf die Analyse von durch IFN γ aktivierten Wirtszellen, es erscheint jedoch wahrscheinlich, dass auch Typ I-IFN diese GBPs induzieren können. Erst kürzlich konnte ein wichtiger Regulator der Chlamydien-induzierten IRG-Induktion identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um die Calcium-abhängige Phospholipase cPLA2 (Vignola et al., 2010). cPLA2 scheint eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunantwort gegenüber *C. trachomatis* zu spielen. Die Lipase vermittelt über die Aktivierung der MAPK p38 die Induktion von IFN β , welches wiederum zu einer Expression von Irgb6 führt und eine signifikante Reduktion der *C. trachomatis*-Replikation zur Folge hat. Es wird vermutet, dass cPLA2 eine Rolle bei der intrazellulären Erkennung der Chlamydien, insbesondere durch Modulation der Stabilität der Inklusionsmembran, spielt (Vignola et al., 2010).

Ein weiterer potentiell IFN-vermittelter antibakterieller Abwehrmechanismus ist abhängig von der Induktion des Enzyms Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO). Bei IDO handelt es sich um ein

Enzym, das die essentielle Aminosäure Tryptophan zu N-Formylkynurenin abbaut (Hayaishi et al., 1975). Eine durch IFN γ -verstärkte Aktivität von IDO führt zu einer Hemmung der *C. pneumoniae*-Replikation in humanen glatten Aortamuskelzellen (Pantoja et al., 2000). Inwieweit auch Typ I-IFN in der Lage sind, IDO zu induzieren, bzw. zu aktivieren, könnte Gegenstand weiterer Studien sein. In diesem Zusammenhang müsste die durch IFN γ ausgelöste persistierende Infektion berücksichtigt werden.

Eine zentrale Rolle wird den Typ I-IFN auch in der Regulation der Stickstoffmonoxid-(NO)-abhängigen Wirtsabwehr nach Infektionen mit *Chlamydia* und *Leishmania* zugesprochen (Diefenbach et al., 1998; Gao et al., 1998; Johnson et al.). Aktuelle Studien zeigen ein inhibiertes Wachstum von *Chlamydia muridarum* durch die IFN γ -bedingte Induktion der Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) (Zhang et al., 2012). Da auch IFN β dazu in der Lage ist, die Produktion von iNOS zu induzieren und damit intrazelluläre Bakterien abzutöten, könnte dies auch in Endothelzellen zu einer Restriktion von Chlamydien führen (Utaisincharoen et al., 2004).

Aktuelle Studien zeigen eine Beteiligung der Caspase-11 an der angeborenen Immunantwort gegenüber intrazellulären Bakterien (Aachoui et al., 2013). Eine ASC-Inflammasom-unabhängige Aktivierung der Caspase-11 erwies sich als protektiv gegenüber Infektionen mit *S. typhimurium* und *Burkholderia* (Aachoui et al., 2013). Ausschließlich gram-negative Bakterien scheinen dazu in der Lage zu sein, über TRIF und IFN β die Caspase-11 zu induzieren und aktivieren (Kayagaki et al., 2013; Rathinam et al., 2013). Somit wäre es möglich, dass die Caspase-11 an den oben beschriebenen hemmenden Effekten von IFN β auf die Chlamydieninfektion beteiligt ist. Aufschluss hierüber könnten zukünftig unter anderem Experimente mit „Knock-out“-Zellen sowie Caspase-11-Inhibitoren (z. B. Wedelolaceton) erbringen.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die durch Typ I-IFN induzierten antiviralen Effektoren zum Teil bekannt, die Typ I-IFN-stimulierten, potentiell antibakteriellen Moleküle jedoch noch unzureichend untersucht sind. Typ I-IFN haben im Rahmen von bakteriellen Infektionen jedoch sowohl protektive (Decker et al., 2005; Däubener und MacKenzie, 1999; Njau et al., 2009; Howard, 2008; Bukholm et al., 1984; Niesel et al., 1986) als auch schädliche Auswirkungen für den Wirt. So zeigen Experimente mit IFNAR-defizienten Mausmakrophagen eine IFNAR-vermittelte Restriktion der Legionellenvermehrung (Coers et al., 2007; Lippmann et al., 2011). In intrazellulären Infektionen mit *Mycobacterium tuberculosis* und *Listeria monocytogenes*

scheinen Typ I-IFN sowohl *in vitro* als auch *in vivo* für die Wirtszelle von Nachteil zu sein (Auerbuch et al., 2004; Bouchonnet et al., 2002; Carrero et al., 2004; Manca et al., 2001; O'Connell et al., 2004; Stockinger et al., 2002).

Von großem Interesse wäre somit insgesamt eine Erforschung der beteiligten Faktoren der intrazellulären Resistenzvermittlung. Ein Fokus könnte auf die genannten sowie neue noch uncharakterisierte ISGs gelegt werden. Die „Microarray-Technik“ könnte hierbei von großem Nutzen sein um einen besseren Überblick über die durch *C. pneumoniae* induzierten ISGs im humanen Endothel zu bekommen. Dadurch könnten wichtige Erkenntnisse für die Risikoabschätzung und Prophylaxe sowie für die Entwicklung neuartiger Therapiestrategien gegenüber intrazellulären Pathogenen erlangt werden.

3.4. NLRX1 hemmt die *C. pneumoniae*-Infektion in Endothelzellen und Makrophagen

Das Bakterium *C. pneumoniae* bildet im Rahmen seines biphasischen Lebenszyklus zwei unterschiedliche Formen aus. Die extrazelluläre Infektionsformen, die EBs, infizieren die Wirtszelle und differenzieren sich intrazellulär zu RBs, welche sich über Zweiteilung vermehren und sich wieder zu EBs zurückentwickeln, die dann wiederum durch Lyse oder Extrusion aus der Wirtszelle freigegeben werden. Extrazellulär vorhandene EBs werden vom angeborenen Immunsystem durch TLR2 und TLR4 erkannt (Prebeck et al., 2003; Bulut et al., 2002; Kol et al., 2000; Wantia et al., 2011; Paolillo et al., 2012). Inwieweit Chlamydien intrazellulär vom Immunsystem erkannt und in ihrer Vermehrung kontrolliert werden können, ist bislang jedoch nur unzureichend verstanden. Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *C. pneumoniae* dazu in der Lage ist, über MAVS IFN β zu induzieren, welches sich wiederum negativ auf die bakterielle Replikation in Endothelzellen auswirkt. NLRX1 wurde zunächst als potentieller Regulator dieses Signalweges angesehen. NLRX1 inhibiert die IFN β -Produktion bei einer Virusinfektion (Moore et al., 2008), scheint aber auch an weitere intrazelluläre Abwehrmechanismen, wie die Induktion von ROS und Autophagie zu stimulieren (Abdul-Sater et al., 2010; Tattoli et al., 2008; Lei et al., 2012). Das Ziel des zweiten Teils der Arbeit war es, die Bedeutung von NLRX1 für die Infektion mit *C. pneumoniae* und die Regulation der Typ I-IFN sowie weitere zellautonome Abwehrmechanismen zu untersuchen.

Bei NLRX1 handelt es sich speziesübergreifend um ein hoch konserviertes Protein, das ubiquitiär exprimiert wird (Moore et al., 2008). Die konstitutive Expression von NLRX1 konnte

bereits in verschiedensten humanen Zelllinien nachgewiesen werden, darunter HeLa-, HEK-, Jurkat- und THP-1-Zellen (Tattoli et al., 2008). In dieser Arbeit zeigte sich, dass NLRX1 in uninfizierten und in mit *C. pneumoniae* infizierten humanen Endothelzellen konstitutiv exprimiert wird (Abb. 11A). Die Ergebnisse zeigen ferner, dass NLRX1 an der Bekämpfung einer intrazellulären Infektion von humanen Endothelzellen und Mausmakrophagen mit *C. pneumoniae* beteiligt ist. So hatte die Expressionshemmung von NLRX1 mittels spezifischer siRNA in humanen Endothelzellen eine ca. 4,5fach erhöhte Chlamydienvermehrung zur Folge im Vergleich zu Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen (Abb. 11C-E). Übereinstimmend konnte eine höhere Anzahl von *C. pneumoniae* in NLRX1-defizienten Mausmakrophagen im Vergleich zu Wildtyp-Makrophagen nachgewiesen werden (Abb. 11G-I).

Entgegengesetzt zu den hier dargestellten Ergebnisse zeigte eine Studie aus dem Jahre 2010 einen positiven Einfluss von NLRX1 auf die *C. trachomatis*-Infektion in HeLa-Zellen und Mausfibroblasten (Abdul-Sater et al., 2010). In dieser Arbeit wird postuliert, dass NLRX1 über die Induktion einer ROS-Produktion und einer sich daraus ergebenden Aktivierung des NLRP3-Inflammasom die *C. trachomatis*-Replikation verstärkt. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz dieser Ergebnisse ist die unterschiedliche experimentelle Herangehensweise zur Untersuchung des Einflusses des Inflammasoms auf die chlamydiale Infektion. Die Arbeitsgruppe von Abdul-Sater verwendete ausschließlich einen chemischen Inhibitor der Caspase-1, wohingegen die Vermehrung der Chlamydien in der vorliegenden Arbeit in ASC-defizienten Makrophagen und in mit zwei Sequenzen siRNA behandelten (siASC) primären Endothelzellen gemessen wurde (Abb. 13A-D). Möglicherweise beruhen die unterschiedlichen Ergebnisse auch auf der Verwendung verschiedener Chlamydienpezies, da die Sequenzhomologie zwischen *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydoghila pneumoniae* sehr gering ist (Kalmann et al., 1999). Desweiteren könnten Unterschiede in Expression und Funktion von NLRX1 in Endothelzellen, Makrophagen und Epithelzellen unterschiedlich sein und somit ebenfalls eine Erklärung für die abweichenden Ergebnisse darstellen.

3.5. Mechanismus der NLRX1-vermittelten zellautonomen Resistenz gegenüber einer Infektion mit *C. pneumoniae*

3.5.1. Beteiligung von Typ I-IFN

Wie vorangegangen beschrieben wurde, hatte NLRX1 einen hemmenden Einfluss auf die intrazelluläre Vermehrung von *C. pneumoniae* in Endothelzellen und Mäusmakrophagen. Im Folgenden sollen mögliche Mechanismen diskutiert werden, welche potentiell von NLRX1 vermittelt werden und für die Hemmung der *C. pneumoniae*-Replikation verantwortlich sind.

Eine MAVS-abhängige Typ I IFN-Produktion kontrolliert, wie im ersten Teil der Arbeit gezeigt, die *C. pneumoniae* Infektion in humanen Endothelzellen. NLRX1 wurde als negativer Regulator der Typ I-IFN-Produktion beschrieben (Moore et al., 2008; Allen et al., 2011; Lei et al., 2012). Somit war die initiale Hypothese, dass NLRX1 die Chlamydien-stimulierte IFN β -Produktion hemmt und somit die Infektion positiv beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit wurde nach Infektion mit *C. pneumoniae* keine Veränderung der IFN β -Expression in siNLRX1-transfizierten Endothelzellen im Vergleich zu einer Transfektion mit Kontroll-siRNA sowie in NLRX1-defizienten Mäusmakrophagen im Vergleich zu Wildtypzellen beobachtet. Somit scheint eine Regulation der Typ I-IFN-Antwort durch NLRX1 keine Bedeutung für die Infektion von *C. pneumoniae* in Endothelzellen und Makrophagen zu haben.

3.5.2. Regulation von proinflammatorischen Zytokinen (IL-6, IL-1 β und KC) durch NLRX1

Es zeigten sich nach Infektion mit *C. pneumoniae* keinerlei signifikante Veränderungen der Genexpression von KC, mIL-6 und mIL-1 in NLRX1-defizienten Zellen im Vergleich zu Wildtypzellen (Abb. 12C-G). In der Literatur ist der Einfluss von NLRX1 auf den NF- κ B-Signalweg in den letzten Jahren bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht worden. In einigen Studien zeigte sich eine verstärkte NF- κ B-vermittelte Zytokinantwort (z. B. IL-6 und KC) in verschiedenen NLRX1-Loss-of-function-Modellen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Allen et al., 2011; Xia et al., 2011; Soares et al., 2012). Dieses Phänomen konnte nicht nur im

Rahmen einer antiviralen Immunantwort, sondern auch nach Stimulation mit aufgereinigtem LPS beobachtet werden (Allen et al., 2011; Xia et al., 2011; Soares et al., 2012). Chlamydiales LPS unterscheidet sich von dem LPS anderer gram-negativer Bakterien vor allem durch eine niedrigere biologische Aktivität (Ingalls et al., 1995). Diese Tatsache zusammen mit unterschiedlichen Infektionsbedingungen, wie z. B. eine wesentlich kürzere Inkubationszeit in den angeführten Studien, könnten Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse im Vergleich zu denen der vorliegenden Arbeit sein.

Zusammenfassend zeigen die bisherigen Ergebnisse, dass eine NLRX1-Defizienz in Mausmakrophagen nach einer Infektion mit *C. pneumoniae* keinen signifikanten Einfluss auf die frühe proinflammatorische Immunabwehr, wie die Induktion von IL-8 (KC), IL-6 sowie IL-1 hat.

3.5.3. Bedeutung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) für die NLRX1-vermittelte zellautonome Abwehr gegen *C. pneumoniae*

ROS dienen nicht nur als „second messenger“-Moleküle, sondern haben unter anderem auch eine Funktion bei der Abwehr von Pathogenen (z. B. „oxidative burst“,) (Yang et al., 2012). Zwei unterschiedliche Studien beschreiben, dass eine ektope Expression von NLRX1 die Produktion von ROS stimuliert, bzw. nach Infektion mit *Shigella flexneri* und *C. trachomatis* steigert (Abdul-Sater et al., 2010; Tattoli et al., 2008).

Diese Studien dienten als Grundlage für die Hypothese, dass *C. pneumoniae* eine NLRX1-vermittelte ROS-Produktion induziert, die sich anschließend negativ auf das chlamydiale Wachstum auswirkt.

Mehrere Studien zeigten bereits, dass *C. pneumoniae* in der Lage ist, ROS zu induzieren (Kalayoglu et al., 1999; Rivera et al., 2012). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl humane Endothelzellen als auch murine Knochenmarksmakrophagen nach Infektion mit *C. pneumoniae* ROS produzieren. Bei NLRX1 handelt es sich um ein mitochondrial lokalisiertes Protein. *C. pneumoniae* löst jedoch in humanen Endothelzellen keine nennenswerte mitochondriale ROS-Produktion aus (Abb. 13D-F). Das nach einer Infektion mit *C. pneumoniae* gebildete ROS in Endothelzellen wird stattdessen überwiegend durch NADPH-Oxidasen generiert. Diese Ergebnisse stimmen mit der Tatsache überein, dass eine vaskuläre ROS-

Produktion vor allem auf die Aktivität von NADPH-Oxidasen zurückzuführen ist (Touyz et al., 2004; Griendling et al., 2000; Lassegue et al., 2003). Eine Inhibition des so gebildeten ROS durch den Einsatz des NADPH-Oxidasen-Hemmers DPI hatte keinen positiven Einfluss auf Replikation von *C. pneumoniae* sondern führte stattdessen zu einer Hemmung der bakteriellen Vermehrung (Abb. 14B).

Die Induktion der während einer *C. pneumoniae*-Infektion gebildeten Sauerstoffradikale scheint nicht durch eine NLRX1-Defizienz inhibiert zu werden (Abb. 13A-C; Abb. 12C-E). In NLRX1-defizienten Zellen kommt es sogar zu einer verstärkten ROS-Produktion nach Infektion mit *Chlamydomphila pneumoniae*. Dieses Phänomen könnte auf die erhöhte Chlamydienzahl im Vergleich zu Wildtypzellen zurückzuführen sein (Abb. 12C-E).

Somit lässt sich zusammenfassend feststellen, dass Einflüsse von NLRX1 auf die ROS-Produktion höchstwahrscheinlich nicht für die NLRX1-vermittelte Hemmung der *C. pneumoniae* Infektion verantwortlich gemacht werden kann.

3.5.4. Beteiligung der Inflammasome an der NLRX1-abhängigen Hemmung von *C. pneumoniae*

Eine große Gruppe von NLRs (z. B. NLRP3) ist dazu in der Lage, Inflammasome zu bilden. Diese Aktivierung stellt einen Schlüsselmechanismus der angeborenen Immunantwort gegenüber Bakterien, Viren, Pilzen sowie DAMPs dar, der maßgeblich durch eine Caspase 1-abhängige Produktion von IL-1 β und IL-18 vermittelt wird. Anhand eines *in vivo*-Infektionsmodells mit *C. pneumoniae* zeigte sich eine essentielle Beteiligung von IL-1 β an der Wirtszellabwehr (Shimada et al., 2011). Um Informationen über eine mögliche Beteiligung von NLRX1 an der IL-1 β -Induktion zu bekommen, wurde die Produktion von IL-1 β in NLRX1^{-/-} Zellen untersucht. In der vorliegenden Arbeit ergab die Infektion von NLRX1-defizienten murinen Knochenmarksmakrophagen mit *C. pneumoniae* weder eine veränderte IL-1 β -mRNA-Expression noch eine veränderte IL-1 β -Sekretion im Zellüberstand im Vergleich zu infizierten Wildtypzellen (Abb. 12F, G).

Als zentrales Adapterprotein ist ASC an der Aktivierung der Caspase-1 durch mindestens vier verschiedene NLR-Inflammasom-Komplexe essentiell beteiligt (NLRP1, NLRC4, NLRP6, und NLRP3) und war somit auch das Ziel weiterer „loss of function“-Experimente (Sanddinger et

al., 2013). In den ASC-defizienten Mausmakrophagen konnte im Vergleich zu Wildtypzellen keine Veränderung der Chlamydien-Replikation festgestellt werden, obwohl, wie erwartet diese Zellen kein IL-1 β produzieren konnten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Beteiligung des ASC-abhängigen Inflammasoms an der NLRX1-vermittelten Chlamydien-Inhibition ausgeschlossen werden kann.

3.5.5. Beteiligung von Autophagie an der NLRX1-abhängigen Hemmung von *C. pneumoniae*

Eine Regulation der proinflammatorischen Zytokinantwort durch NLRX1 wurde bereits in mehreren Studien beschrieben (Allen et al., 2011, Moore et al., 2008). Des Weiteren gibt es aktuelle Hinweise auf eine molekulare und funktionelle Assoziation zwischen den Autophagie-relevanten ATG-Proteinen und NLRX1. Autophagie spielt sowohl in der adaptiven als auch in der angeborenen Immunantwort eine wesentliche Rolle. Als zellautonomer Abwehrmechanismus dient die Autophagie durch die Bildung von Autophagolysosomen unter anderem dem Abbau von intrazellulären Bakterien. Somit ist die Wirtszelle auch in der Lage, Bakterien zu eliminieren die dem phagolysosomal Abbauweg entkommen sind (Levine und Kroemer, 2008; Swanson, 2006). Diese Tatsache trifft auf die chlamydiale Inklusion in Epithelzellen zu, die nicht mit Lysosomen fusioniert und somit eine Möglichkeit gefunden hat, dem Abbau zu entgehen (Eissenberg et al., 1981; Scidmore et al., 2003; Al-Younes et al., 1999).

Eine erst kürzlich publizierte Studie zeigt eine negative Regulation der Typ I-IFN-Antwort von NLRX1 mittels einer direkten Interaktion mit dem mitochondrialen Elongationsfaktor TUFM (Lei et al., 2012). Darüber hinaus führt die Bildung eines Proteinkomplexes von NLRX1/TUFM mit dem ATG5-ATG12-Konjugat zu einer Verstärkung der Autophagie nach viraler Infektion. Anhand dieser Studie stellte sich nun die Frage, inwieweit die Autophagie an der NLRX1-vermittelten Chlamydienrestriktion beteiligt ist. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Replikation von *C. pneumoniae* in mit ATG5-spezifischer siRNA transfizierten Endothelzellen im Vergleich zu Zellen, welche mit Kontroll-siRNA behandelt wurden, unverändert blieb. Eine NLRX1-vermittelte Chlamydienrestriktion durch Autophagie konnte demnach ausgeschlossen werden. Übereinstimmend wurde bereits in weiteren Studien gezeigt, dass die Autophagie zwar einen hemmenden Einfluss auf die Replikation von *C.*

trachomatis in IFN γ -aktivierten Zellen hat, sich dieser Einfluß jedoch nicht in unbehandelten Zellen beobachten ließ (Al-Zeer et al., 2009; Al-Zeer et al., 2013).

3.5.6. Zelltoxizität von NLRX1

Um auszuschließen, dass die Effekte von NLRX1 auf die Vermehrung der Chlamydien in Endothelzellen durch die Beeinflussung des Zielzelltodes hervorgerufen werden, wurde die Menge der freigesetzten Laktat-Dehydrogenase (LDH) untersucht. Durch die Messung der Freisetzung von LDH durch zerstörte bzw. sterbende Zellen ist es möglich, die Gesamtzytotoxizität (in %) zu ermitteln. Die Untersuchungen ergaben eine leichte Erhöhung der Zelltoxizität sowohl durch Transfektion, als auch durch die Infektion mit *Chlamydomytila pneumoniae*. Es zeigte sich jedoch keinerlei Unterschied zwischen den mit csi und siNLRX1-transfizierten Zellen (Daten hier nicht gezeigt). Daraus lässt sich schließen, dass NLRX1 keinen wesentlichen Einfluss auf die Zytotoxizität der Wirtszelle hat. Somit ergeben sich keine Hinweise darauf, dass NLRX1 über die Induktion von Zelltod die *C. pneumoniae*-Infektion in Endothelzellen hemmt.

3.5.7. Induktion NLRX1-abhängiger Resistenzmechanismen durch chlamydiale Faktoren

Bei NLRX1 handelt es sich um ein Protein, das sowohl einen Einfluss auf die inflammatorische Immunantwort als auch auf die Produktion reaktiver Sauerstoffradikale zu haben scheint (Arnoult et al., 2009 und Tattoli et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass NLRX1 vermutlich über einen ROS-, Inflammasom-, Autophagie- und Typ I-IFN-unabhängigen Signalweg eine Inhibition des chlamydialen Wachstums vermittelt. Abschliessend stellt sich somit die Frage, welche chlamydialen Faktoren diesen NLRX1-abhängigen Abwehrmechanismus aktivieren und ob NLRX1 ggf. direkt chlamydiale Moleküle bindet. Diese Fragestellung wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, soll jedoch im Folgenden kurz diskutiert werden.

Eine kürzlich publizierte Arbeit konnte zeigen, dass NLRX1 virale RNA und dessen synthetisches Analogon polyI:C binden kann (Hong et al., 2012). Es wäre somit denkbar, dass chlamydiale Nukleinsäuren direkt an NLRX1 binden und den NLRX1-abhängigen Abwehrmechanismus aktivieren. In diesem Falle bliebe jedoch unklar, wie die chlamydialen

Nukleinsäuren aus der membranumgebenden Inklusion, in der sich die Chlamydien vermehren, ins Wirtszellzytoplasma, und somit in Kontakt mit NLRX1 kommen könnten. Ein in der Vermehrungsphase exprimiertes Typ-III-Sekretionssystem könnte hierbei möglicherweise beteiligt sein. Des Weiteren kommt es im Anschluss an diese Vermehrungsphase oft zu einer Zerstörung, bzw. Verletzung der Wirtszelle. Im Anschluss führt dies zu einer Freisetzung endogener „verletzungsassoziierter“ zellulärer Bestandteile, den DAMPs (engl.: „damage associated molecular patterns“). Diese Faktoren sind ebenso wie die PAMPs dazu in der Lage, die angeborene Immunantwort zu stimulieren (Zhang et al., 2010). Möglicherweise ist NLRX1 auch an der Detektion von DAMPs beteiligt. Diese Identifikation der NLRX1-Aktivatoren in der *C. pneumoniae*-Infektion sollte in zukünftigen Untersuchungen angestrebt werden.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Wirtszellen verfügen über bisher unzureichend verstandene zellautonome Immunmechanismen zur Abwehr von intrazellulären Bakterien. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Abwehrmechanismen charakterisiert, die in humanen Endothelzellen, bzw. in murinen Makrophagen Infektionen durch *C. pneumoniae* bekämpfen (Abb. 15). Zum einen konnte gezeigt werden, dass *C. pneumoniae* über einen MAVS-abhängigen Signalweg in humanen Endothelzellen erkannt wird. Diese Erkennung aktiviert die Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 und nachfolgend eine IRF3/7-abhängige Typ I-IFN-Produktion. Typ I-IFN bewirken autokrin eine Kontrolle der intrazellulären Infektion mit *C. pneumoniae*. Zum anderen wurde gezeigt, dass das mitochondriale NLR-Molekül NLRX1 eine zellautonome Abwehr gegen *C. pneumoniae* in humanen Endothelzellen und in murinen Makrophagen vermittelt. Diese NLRX1-abhängige intrazelluläre Abwehr ist unabhängig von verschiedenen, bisher mit NLRX1 in Verbindung gebrachten Signalwegen. Die Ergebnisse zeigen somit zum ersten Mal, dass NLRX1 eine zellautonome Abwehr gegen intrazelluläre Bakterien vermittelt. Zukünftige Arbeiten sollten aufklären, welche chlamydialen Moleküle durch die MAVS- und NLRX1-abhängigen Signalwege erkannt werden. Ein Kandidat hierfür ist chlamydiale RNA, da MAVS als das Adaptermolekül der zytosolischen RNA-Rzeptoren RIG-I und MDA5 gilt und eine direkte Bindung von viraler und synthetischer RNA an NLRX1 kürzlich gezeigt werden konnte. In diesem Falle bliebe jedoch zusätzlich zu klären, wie chlamydiale RNA in das Wirtszellzytosol gelangen könnte. Weitere offene Fragen betreffen die Mechanismen sowohl der Typ I-IFN-abhängigen intrazellulären Abwehr von Chlamydien in Endothelzellen als auch der NLRX1-vermittelten zellautonomen Immunmechanismen in Endothelzellen und Makrophagen. Schliesslich wäre es interessant zu untersuchen, welche Funktionen diese beiden Abwehrmechanismen für die *C. pneumoniae*-Infektion *in vivo* haben. Daraus gewonnene Erkenntnisse könnten bei der Erforschung neuartiger antibakterieller Therapien hilfreich sein. Diese ist angesichts der weltweiten signifikanten Zunahme von mehrfach-resistenten Infektionserregern, unbedingt notwendig.

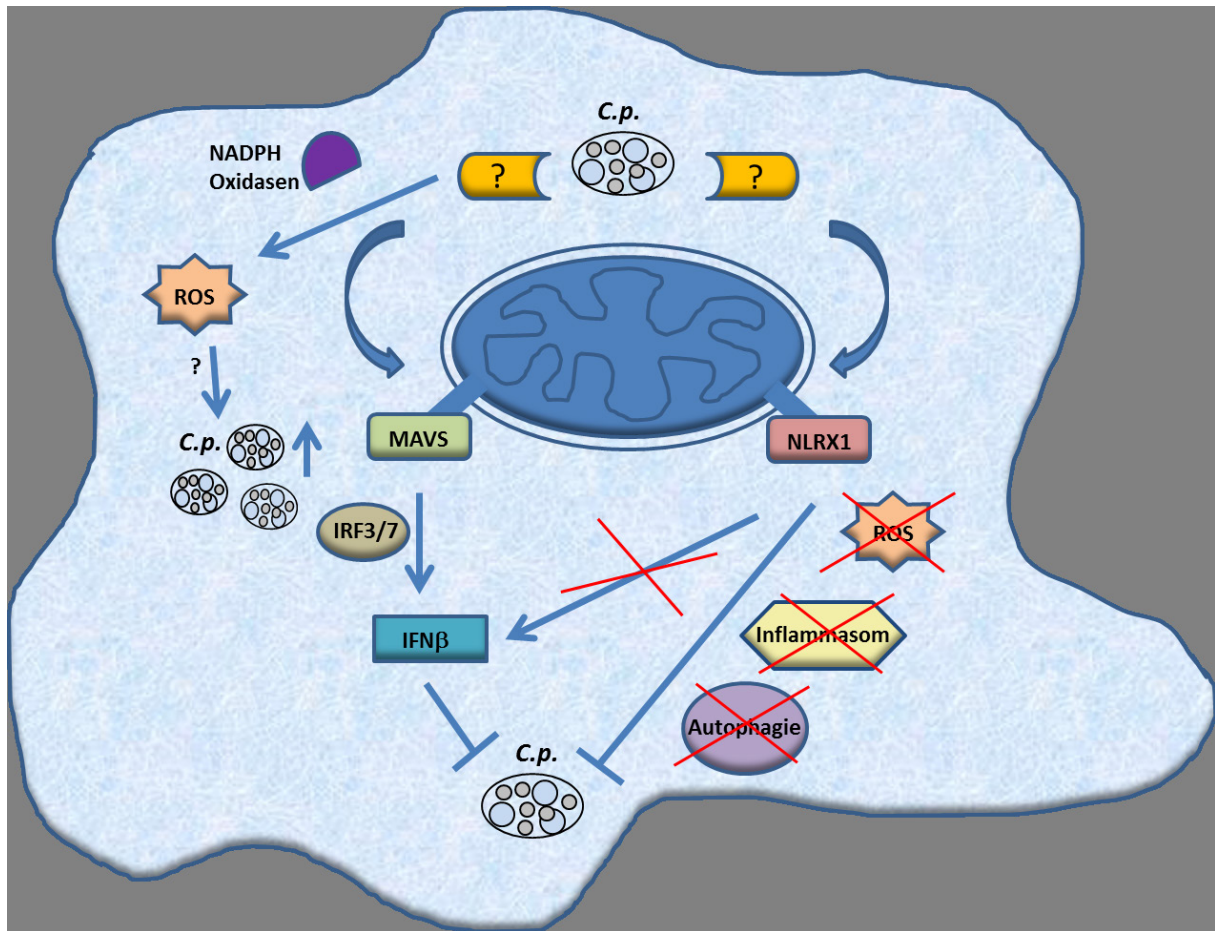


Abb. 15: Zusammenfassung der in der Arbeit untersuchten angeborenen Abwehrmechanismen gegen eine *C. pneumoniae* Infektion in humanen Endothelzellen. Über einen noch unbekannten Rezeptor werden Moleküle des obligat intrazellulären Erregers *C. pneumoniae* detektiert. Es kommt zu einer Induktion von zwei verschiedenen Signalwegen. MAVS-vermittelt werden die Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 aktiviert und führen zu einer Produktion von IFN β . IFN β bewirkt über noch unbekannte zellautonome Resistenzmechanismen eine Inhibition des intrazellulären Chlamydienwachstums. Auch die NADPH-vermittelte Produktion von ROS führt zu einer reduzierten Chlamydienvermehrung. Der NOD-like-Rezeptor NLRX1 ist ebenfalls in der Lage, das Chlamydienwachstum zu hemmen. Bezüglich der Wirkweise von NLRX1 konnte eine Beteiligung intrazellulärer Resistenzmechanismen wie die Induktion von ROS, Autophagie sowie die Induktion des Inflammasoms aber auch die Wechselwirkung mit dem MAVS/IFN β -Signalweg ausgeschlossen werden.

5. Summary

The cell autonomous defense mechanisms against intracellular bacteria in host cells are so far insufficiently understood. In the present work two defense mechanisms involved in the elimination of *C. pneumoniae* in human endothelial cells and in murine macrophages were characterized (Abb. 15). It could be shown that *C. pneumoniae* is recognized by a MAVS-dependent signal pathway in human endothelial cells. This recognition activates the transcription factors IRF3 and IRF7 and subsequently an IRF3/7-dependent type I-IFN production. Type I-IFNs induce an autocrine control mechanism against the intracellular infection with *C. pneumoniae*. Additionally it could be shown for the first time that the mitochondrial NLR molecule NLRX1 mediates a cell autonomous defense mechanism against *C. pneumoniae* and most likely other intracellular bacteria in human endothelial cells and murine macrophages. This NLRX1-dependent intracellular defense mechanism is independent of the different mechanisms which were so far linked to NLRX1. Further work should clarify, which chlamydial molecules are recognized by the MAVS- and NLRX1-dependent pathways. A promising candidate for such a molecule could be chlamydial RNA since MAVS is considered to be an adapter molecule of the cytosolic RNA receptors RIG-I and MDA5. Recently a direct binding of viral and synthetic RNA molecules to NLRX1 could be shown. In this case the question must be clarified how chlamydial RNA could enter the host cell cytosol. Further open questions concern the mechanisms of the type I-IFN-dependent intracellular protection from Chlamydia in endothelial cells and the NLRX1-mediated cell autonomous immune mechanisms in endothelial cells and macrophages. Finally it would be interesting to examine the relevance of these two defense mechanisms for *C. pneumoniae* infection *in vivo*. The outcome of these studies could be very helpful in the development of novel antibacterial therapies.

6. Material

6.1. Geräte

Autoklav	Systec GmbH, Wettenberg
Analysenwaage	KERN & Sohn GmbH, Balingen
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
ELISA-reader	Dynatech, Guernsey; England
Magnetrührgerät	VWR 205, Henry Troemner, U.S.A
Konfokales Mikroskop	LSM5 Pascal, Zeiss, Jena
Konfokales Mikroskop	Carl Zeiss Imaging System
	LSM 780, Jena
Kühlschränke	Kühl-Gefrierkombination: Liebherr, Berlin Tiefkühlschrank: Heraeus, Hanau
Mikrowelle	Siemens, Berlin
Multipetten	Eppendorf, Hamburg
Nass-Blot-Apparatur	BIO-RAD, München
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
pH-Meter	Knick GmbH & Co. KG, Berlin
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Spannungsgeräte (Power supply)	EPS 600 Pharmacia Biotech, Freiburg BIO-RAD, München
Spektralphotometer	UVIKON, Kontron; Basel
Sterilbank	Heraeus, Hanau Filter: Kendro, Langenselbold
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg

Thermocycler	Eppendorf, Hamburg
Vortexer	IKA, Staufen
Zentrifugen:	Tischzentrifuge Hettich, Vertrieb Berlin
	Tischzentrifuge (klein) Tomy Seiko, Tokyo
UV-Lampe	GIBCO, Karlsruhe
Wasserbad	Köttermann, Hänigsen
Wasseraufbereitungssystem (Aqua bidest)	Millipore, Schwalbach
Zellkultur-Inkubator	Heraeus, Hanau

6.2. Zubehör

Blotmembran aus Nitrocellulose Hybond-ECL	Amersham, Braunschweig
Einmal-Handschuhe Nitrile	Ansell, Brüssel
Einmalküvetten	Sarstedt, Hannover
Filter	Nalgene, Wiesbaden
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Multischalen (6-, 12-, 24- und 96-Loch-Format)	Falcon, Heidelberg
Optilux™ Petri-Schalen	BD Biosciences, New Jersey USA
Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
PCR-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Hannover
Pipettierhilfe	Integra Bioscience, Vancouver; Kanada
Quarzküvette	Hellma, Müllheim

Röhrchen (12 und 50 ml)	Falcon, Heidelberg
Scraper	Costar, Cambridge (USA)
Urinbecher (100 ml)	Sarstedt, Hannover
Zellkulturflaschen (T75)	Falcon, Heidelberg

6.3. Puffer und Lösungen

Blot-Puffer (10x, Western Blot)

Glycin	144 g	Serva, Heidelberg
Trizma Base	30 g	Sigma, München
Aqua bidest	ad 1000 ml	

Blot-Puffer (1x, Western Blot)

Methanol	200 ml	Merck, Darmstadt
Blot Puffer (10x)	80 ml	
Aqua bidest.	ad 1000 ml	
PBS 1 x		PAA, Cölbe

Eindeckelmedium

Permafluor	Beckman Coulter, Krefeld
Mowiol	Sigma-Aldrich, München

Laemmli-Puffer (4x)

Glycerol	0,8 ml	Merck, Darmstadt
Tris-HCL 0,5M, pH 8,3	1,0 ml	Sigma, München
SDS (10 %)	1,6 ml	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	1 %, 0,4 ml	Pharmacia Biotech AB, Uppsala
β-Mercaptoethanol*	1 %, 0,4 ml	Serva, Heidelberg
Aqua bidest.	0,95 ml	

Laufpuffer (5x, SDS_Gel)

Glycin	72 g	Serva, Heidelberg
Trizma Base	15 g	Sigma, München
SDS	5 g	Serva, Heidelberg
Aqua bidest.	ad 1000 ml	

Lysepuffer (Proteinextraktion)

Tris-HCl, pH 7,4	100 µl aus 500 mM	Sigma, München
Nonidet® P-40	50 µl aus 20%	Sigma, München
10 µl PMSF	10 µl aus 100 mM	Sigma, München
Antipain	5 µl aus 5 mg/ml	Sigma, München
Leupeptin	5 µl aus 5 mg/ml	Sigma, München
Pepstatin	5 µl aus 5 mg/ml	Sigma, München
EDTA	1 µl aus 250 mM	AppliChem, Heidelberg
	ad 1 ml Proteinwaschpuffer	

Phosphoproteinwaschpuffer

Natiumorthovanadat 98 % ig	200 mM	Sigma, München
Natriumpyrophosphat	150 mM	Sigma, München
Natriumfluorid 99 %ig	1 M	Sigma, München
Dulbeccos PBS	1 x	PAA, Cölbe

Sammelgelpuffer (0,5M Tris-HCL, pH6,8)

Trizma base	6 g	Sigma, München
Aqua bidest	ad 1000 ml	

Sammelgel (für ca. 2 Gele)

Sammelgelpuffer	1 ml	
Acrylamid/Bisacrylamid	534 µl	Serva, Heidelberg
SDS 10 %	0,04 ml	Serva, Heidelberg
APS	0,04 ml	Serva, Heidelberg
TEMED	0,01 ml	R&D Systems, Wiesbaden
Aqua bidest.	2,426 ml	

SPG-Puffer

Saccharose	75 g	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	0,52 g	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	1,53 g	Merck, Darmstadt
Glutaminsäure	0,72 g	Merck, Darmstadt
Aqua bidest.	ad 1000 ml	

TAE-Puffer, pH 8,0:

Trizma-Base	4,84 g	Sigma, München
Eisessig	1,14 ml 100 %ig	Merck, Darmstadt
EDTA 0,5 M Roth	2 ml aus 0,5 M	Roth, Karlsruhe
A. bidest.	ad 1000 ml	

Trenngel-Puffer 1,5M, pH8,8

Trizma-Base	18,15 g	Sigma, München
Aqua bidest.	ad 100 ml	

Trenngel 13%

Trenngelpuffer	2,5 ml	Serva, Heidelberg
Acrylamid/ Bisacrylamid 40%	3,25 ml	Serva, Heidelberg
SDS 10%	100 µl	Serva, Heidelberg
APS	0,05 ml	Serva, Heidelberg
TEMED	0,005 ml	R&D Systems, Wiesbaden
Aqua bidest.	4,10 ml	

Verdünnungsmedium (VM, Konfokalmikroskopie)

PBS	20 ml	PAA, Cölbe
BSA,	0,2 g	Sigma, München
TWEEN20	0,01 g	Sigma, München

6.4. Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid/ Bisacrylamid 40%	Serva, Heidelberg
Agarose	Promega, Madison, WI, U.S.A
APS	Serva, Heidelberg
Amphotericin	Boehringer, Ingelheim am Rhein
Antipain	Sigma, München
Aprotinin	Sigma, München
Bradford-Reagenz	Biorad, München
Bromphenolblau	Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden
1,4-Dithiothreitol	Merck, Darmstadt
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Ethidiumbromid-Lösung	Gibco, Karlsruhe
FCS	Gibco, Karlsruhe
Formaldehyd (37%)	Sigma, München
Gelatine	Sigma, München
Glutamin (L-)	Gibco, Karlsruhe
Glutaminsäure	Merck, Darmstadt
Glycin	Serva, Heidelberg
Glycerol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kalimhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Sigma, München
β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg

Methanol	Merck, Darmstadt
NaCl	Sigma, München
Nonidet P40	BioChemika, Duisburg
PFA	Merck, Darmstadt
PMSF	Sigma, München
Poly dA-dT (0,1µg/µl)	InvivoGen, Toulouse
Ponceau-S	Sigma, München
Saccharose	Merck, Darmstadt
SDS	Serva, Heidelberg
Sodium Fluorid	Sigma, München
Sodium Orthovanadat	Sigma, München
Sodium Pyrophosphat	Sigma, München
TEMED	R&D Systems, Wiesbaden
Triton X-100	Boehringer, Ingelheim am Rhein
Trizma Base	Sigma, München
Trypsin EDTA	Gibco, Karlsruhe
Tween 20	Sigma, München
Wasser (für Spülzwecke)	Ampuwa, Fresenius Kabi, Bad Homburg
Wasser (für Injektionszwecke)	Ampuwa, Fresenius Kabi, Bad Homburg

Marker

DNA-Marker 100 kb	Gene ruler, Biomol, Hamburg
Protein Marker:	
Full range Rainbow,	Amersham, Braunschweig
Precision Plus Protein™ Kaleidoscope	BIO-RAD, München

6.5. Enzyme

AMV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
m-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Red Taq Polymerase	Sigma, München
Ribonuklease A (RNase A)	AppliChem, Darmstadt
RNasin, rekombinant	Promega, Mannheim
Trypsin/EDTA 1 x	Gibco, Karlsruhe

Alle übrigen Reagenzien ohne Angabe der Bezugsquelle wurden bei den Firmen Sigma, München; Merck, Darmstadt und Roth, Karlsruhe erworben.

6.6. Kommerzielle Systeme

Cell line Nucleofector KIT solution V	Amara , Lonza AG; Basel
HUVEC Nucleofector KIT	Amara , Lonza AG; Basel
High perfect transfection reagent	Qiagen, Hilden
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
PerfectPure RNA Cultured Cell Kit	5 prime, Hamburg
Human Interferon- β (HuIFN β)-ELISA Kit	Fujirebio INC, Tokyo
Hi Speed Plasmid Midi Kit	Quiagen, Hilden
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Mouse IL-1 beta ELISA Ready-SET-Go!	ebioscience, San Diego U.S.A.
BD OtpEIA Human IL-8 Elisa Set reagent	BD Biosciences, New Jersey USA
BD OtpEIA mouse IL-6 Elisa Set reagent	BD Biosciences, New Jersey USA
Mouse IL-1 beta ELISA Ready-SET-Go!®	ebioscience, San Diego U.S.A.

6.7. Oligonukleotide

Oligonukleotide (siRNA)

Die verwendete siRNA wurde vom Hersteller Ambion (Huntingdon, U.K.) bezogen. HUVECs wurden nach Herstellerangaben mittels eines Amaxa Nucleofectors (Amata, Köln Deutschland) mit 2µg siRNA transfiziert. Im Rahmen der Replikationsexperimente wurde die siRNA hauptsächlich mit dem HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen, Valencia, CA) transfiziert.

csi (control) siRNA	sense 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUtt- antisense 5'-ACGUGACACGUUCGGAGGAGAAAtt-
IRF3 s1	sense 5'-GGAGGAUUUCGGAAUCUUCtt- antisense 5'-GAAGAUUCCGAAAUCCUCCtg-
IRF3 s2	sense 5'-ACACCUCUCCGGACACCAAtt- antisense 5'-UUGGUGUCCGGAGAGGUGUct-
IRF7 s1	sense 5'-GCCUCUAUGACGACAUCGAtt antisense 5'-UCGAUGUCGUCAUAGAGGCtg-
IRF7 s2	sense 5'-CGAGCUGCACGUUCCUAUAtt- antisense 5'-UAUAGGAACGUGCAGCUCGgg-
MAVS s1	sense 5'-UAGUUGAUCUCGCGGACGAtt- antisense 5'-UCGUCCGCGAGAUCAACUAtt
MAVS s2	sense 5'-CCACCUUGAUGCCUGUGAAtt- antisense 5'-UUCACAGGCAUCAAGGUGGtt

siNLRX1 s1	sense 5'-GCGGUUUCUCUGAUACCAAtt antisense 5'-UUGGUAUCAGAGAAACCGCag
siNLRX1 s2	sense 5'-UCAUCCUGAAUCUGAUCUUt antisense 5'-AAGAUCAGAUUCAGGAUGAtt
siASC s1	sense 5'-UCAUCCUGAAUCUGAUCUUt antisense 5'-AAGAUCAGAUUCAGGAUGAtt
siASC s2	sense 5'-GAUGCGGAAGCUCUUCAGUt antisense 5'-ACUGAAGAGCUUCCGCAUCtt
siATG5 s1	sense 5'-GGGAAGCAGAACCAUACUAtt antisense 5'-UAGUAUGGUUCUGCUUCCCtt
siATG5 s2	sense 5'-CCUUUCAUUCAGAAGCUGUt antisense 5'-ACAGCUUCUGAAUGAAAGGtc

Oligonukleotide (Primer der semiquantitativen PCR)

Folgende Primer wurden bei der Durchführung der semiquantitativen PCR verwendet:

Primer	Sequenz
IFNβ FW IFNβ RV	5'-GCTCTCCTGTTGTGCTTCTCCAC-3' 5'-CAATAGTCTCATTCCAGCCAGTGC-3'
IRF3 FW IRF3 RV	5'-TACGTGAGGCATGTGCTGA-3' 5'-AGTGGGTGGCTGTTGGAAAT-3'
IRF7 FW IRF7 RV	5'-TGCAGAAGGTGGTGGGACA-3' 5'-TGCTATCCAGGGAAGACACA-3'
MAVS FW MAVS RV	5'-ATGCCGTTTGCTGAAGAC-3' 5'-CTAGTGCAGACGCCGCCG-3'

Oligonukleotide (Primer für die quantitative SYBR-Green PCR)

Folgende primer wurden zur Quantifizierung der Chlamydien-DNA verwendet. Ein Abgleich mit GAPDH-spezifischen primern wurde jeweils aus der entsprechenden Gesamt-RNA-Aufreinigung durchgeführt.

Primer	Sequenz
16s rRNA <i>C.p.</i> revers	5'-ACCTTCCGGTAGGGCTACCTT-3'
16s rRNA <i>C.p.</i> FW	5'-GGCGCCTCTCTCCTATAAATAGG-3'
16s rRNA <i>C.p.</i> RV	5'-ATGTGGATGGTCTCAACCCCAT-3'
hGAPDH FW	5'-CCTGGCCAAGGTCATCCATG-3'
hGAPDH RV	5'-GGAAGGCCATGCCAGTGA GC-3'

6.8. Antikörper

<u>Primärantikörper</u>	<u>Herkunft</u>	<u>Hersteller</u>
anti Aktin	Ziege	Santa Cruz, California U.S.A.
anti ERK-2	Maus	Santa Cruz, California U.S.A.
anti FAK		Santa Cruz, California U.S.A.
anti-IRF3(c20)	Ziege	Santa Cruz, California U.S.A.
anti-IRF7 (H-246)	Kaninchen	Santa Cruz, California U.S.A.
anti-MAVS (IPS-1)	Kaninchen	Santa Cruz, California U.S.A.
anti-NLRX1	Kaninchen	Proteintech, Chicago, U.S.A.
anti-NOD9 (NOD9 (D-14)	Ziege	Santa Cruz, California U.S.A.
anti-Pin-1	Kaninchen	Cell signaling
anti-p65	Kaninchen	Santa Cruz, California U.S.A.

Sekundärantikörper für Blot-Analysen/Konfokalmikroskopie

anti Kaninchen (S21) IRDye 800	Ziege	Firma LI-COR Biosciences, Bad Homburg
anti Maus (S15) IRDye 800	Ziege	Firma LI-COR Biosciences, Bad Homburg
anti Ziege (S24) IRDye 800	Esel	Firma LI-COR Biosciences, Bad Homburg

Die Primärantikörper wurden zum größten Teil in einer Verdünnung von 1:1000, die Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt. Als Verdünnungspuffer wurde ein Blockpuffer der Firma Licor Bioscience 1:1 in PBS, bzw. 5 % Milchpulver in PBS verwendet.

Chlamydien-spezifischer Antikörper und Färbereagenzien

anti-Chlamydia-LPS mAb (Maus)	DAKO Cytomation, Cambridgeshire
anti- <i>C. pneumoniae</i> (Maus)	Santa Cruz, Kalifornien, U.S.A.
anti-fluorescein/oregon Green rabbit IgG	Invitrogen, Karlsruhe
anti-mouse ALEXA Fluor 488 conjugated"	Invitrogen, Karlsruhe
ALEXA Fluor 546 Phalloidin	Invitrogen, Karlsruhe
Bromphenolblau	Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden

Ponceau-S-Proteinfärbung

Ponceau-S	1 g	Merck, Darmstadt
Eisessig	50 ml	Merck, Darmstadt
Aqua bidest.	ad 1000 ml	

6.9. Bakterienstämme

Der *Chlamydophila pneumoniae*-Stamm CWL029 (ATCC VR-1310) wurde freundlicherweise vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität zu Lübeck, Molekulare Diagnostik, zur weiteren Anzucht zur Verfügung gestellt. Der *Chlamydia trachomatis*-Stamm CTK, Serovar K wurde dem Labor freundlichst von J.G. Kuipers, Institut für Rheumatologie der medizinischen Hochschule Hannover überlassen.

6.10. Zellen und Zellmedien

Die verwendeten Endothelzellen wurden aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC) gewonnen (Jaffe, E. A. et al., 1973), welche freundlicherweise von der Gynäkologie des Humboldt-Klinikums in Berlin-Reinickendorf zur Verfügung gestellt wurden.

Die HEp-2-Zellen (human, Caucasian, larynx, carcinoma; American Type Culture Collection) wurden uns freundlicherweise vom Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie (Arbeitsgruppe Prof. T.F. Meyer) zur Verfügung gestellt. Bei HEp-2-Zellen handelt es sich um Karzinomzellen des Mundbodens die ein Plattenepithel ausbilden.

Die Wildtyp-Zellen wurden aus dem Knochenmark des Mausstammes Wt C57BL/6 (Jackson Laboratories; Bar Harbor, ME) isoliert. Die NLRX1-defizienten murinen Knochenmarksmakrophagen wurden freundlicherweise von Dr. Olaf Gross vom Biochemischen Institut der Universität Lausanne zur Verfügung gestellt.

HUVEC-Anzuchtmedium

Endothel Basal Medium	500 ml	PAA, Cölbe
Penicillin/Streptomycin (100x)	7 ml	PAA, Cölbe
Glutamin (100x)	5 ml	Gibco, Karlsruhe
FCS*	50 ml	Gibco, Karlsruhe
Amphotericin B (500x)	200 µl	Roche, Grenzach-Wyhlen
EGF (25 µg/ml)	100 µl	Gibco, Karlsruhe
ECGM	10 %	Promo Cell, Heidelberg

* Das für die Zellkulturmedien verwendete FCS wurde für eine Dauer von 30 Minuten bei 56 °C zur Inaktivierung inkubiert.

HUVEC-Infektionsmedium 1% FCS, 5%FCS

Endothel Basal Medium	500 ml	PAA, Cölbe
FCS	1 %/5 %	Gibco, Karlsruhe
Glutamin (100x)	5 ml	Gibco, Karlsruhe

HEp-2-2-Anzuchtmedium

EARLE'S MEM	500 ml	PAA, Cölbe
Hitzeinaktiviertes FCS	50 ml	Gibco, Karlsruhe
L-Glutamin	5 ml	Gibco, Karlsruhe
Nicht essentielle Aminosäuren	5 ml	Gibco, Karlsruhe
Gentamycin	500 µl	Sigma, München
Amphotericin	1ml	Roche, Grenzach-Wyhlen

HEp-2-Infektionsmedium

EARLE'S MEM	500 ml	PAA, Cölbe
L-Glutamin	5 ml	Gibco, Karlsruhe
Nicht essentielle Aminosäuren	5 ml	Gibco, Karlsruhe
Cyclohexamid	500 µl	Sigma, München

BMM-Anzuchtmedium

RPMI 1640		Gibco, Karlsruhe
20 % FCS,		Gibco, Karlsruhe
30 % L-Zell-Überstände		laborintern produziert
1 % Penicillin-Streptomycin		PAA, Cölbe

BMM-Kulturmedium

RPMI 1640		Gibco, Karlsruhe
10 % FCS		Gibco, Karlsruhe
% L-Zell-Überstände		laborintern produziert

7. Methoden

7.1. Kultivierung von Zellen

Alle Arbeiten mit Zellkulturen erfolgten an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S2 unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank mit autoklavierten oder heissluftsterilisierten Materialien, bzw. Geräten oder steril filtrierten Lösungen. Alle mit humanem oder transfiziertem Zellmaterial in Kontakt getretenen Materialien oder Geräte wurden anschließend mit dem Schnelldesinfektionsmittel Deskosept® desinfiziert. Die Zellen wurden in einem CO₂-Begasungsbrutschrank im offenen System bei 37 °C mit 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Alle Medien und Lösungen wurden vor Verwendung auf 37 °C im Wasserbad vorgewärmt.

7.1.1. Gewinnung von human umbilical cord vein endothelial cells (HUVEC)

Endothelzellen wurden aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC) gewonnen (Jaffe, E. A. et al., 1973). Dazu wurden die Nabelschnüre nach Trennung von der Plazenta bei 4°C aufbewahrt. Mit einer sterilen Klemme erfolgte die Sondierung der Vene, anschließend wurden mit einer sterilen Mullkompressen und durch Spülen mit 20 ml sterilem H/H^{+/+} die Blutrückstände entfernt. Zur Ablösung der Endothelzellen wurde die Vene mit einer Nabelschnurklemme verschlossen und mit 0,025 % Worthington CLS Typ II bei 37°C für 20 min inkubiert. Nach Ablassen der Collagenase aus den Nabelschnüren in ein 50 ml Röhrchen mit 1ml FCS erfolgte ein Waschschriff mit 20-25 ml Waschmedium (Medium 199), welches ebenfalls im gleichen Röhrchen aufgefangen wurde. Dann wurden die Endothelzellen pellettiert (10 min bei 300 g) und der Überstand verworfen. Unter den sterilen Arbeitsbedingungen einer Reinraumwerkbank wurde das Zell-Pellet in 15 ml Aufzuchtmedium resuspendiert.

7.1.2. Kultivierung der HUVEC

Die Kultivierung der Zellen in einer mit Gelatine beschichteten und mit 15ml Anzuchtmedium versehenen T75-Zellkulturflasche erfolgt bei 37°C, 5 % CO₂ und 99 % relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank. Das Kulturmedium wurde alle zwei Tage erneuert. Nach 2 bis 4 Tagen

erreichten die Endothelzellen vollständige Konfluenz. Zunächst wurde das Medium verworfen und einmal mit PBS (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) gespült. Pro Flasche wurden 2 ml Trypsin (0,5 %)/EDTA (0,2 %) hinzupipettiert und die Zellkultur für ca. 5 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Noch haftende Zellen wurden durch Beklopfen der Flaschenunterseite abgelöst. Die Suspendierung der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Es folgte eine Zugabe von 7 ml HUVEC-Kulturmedium und nach Aufnahme der Zellsuspension wurden jeweils 3 ml in eine vorher mit Gelatine beschichtete T75-Kulturflasche pipettiert. Nach Hinzugabe von je 7 ml HUVEC-Kulturmedium wurden die Zellen in einem Brutschrank (s.o.) weiterhin bis zur Verwendung kultiviert. In die für den ELISA verwendeten 24-well-Platten, wurden die Zellen aus konfluenten T75-Kulturflaschen 1:1 mit HUVEC-Kulturmedium verdünnt. Vor der Zugabe von jeweils 500 µl der Verdünnung wurden die wells mit Gelatine beschichtet.

7.1.3. Kultivierung von HEp-2-Zellen (humane Epithelzellen)

Für die Chlamydienkultur und die Reinfektionsexperimente wurden HEp-2-Zellen verwendet. Diese Epithelzelllinie wurde ursprünglich aus einem Larynxkarzinom isoliert. Die HEp-2-Zellen wurden in Wachstumsmedium bei 37°C und 5 % CO_2 in 75 cm²-Zellkulturflaschen kultiviert und alle 3 Tage im subkonfluenten Stadium passagiert. Dazu wurden die Zellen mit sterilem PBS gewaschen und durch Zugabe von 1ml Trypsin/EDTA für 5-10 min abgelöst. Die Zellsuspension wurde mit 5-fachem Volumen Wachstumsmedium zur Inaktivierung des Trypsins verdünnt und mit je 12 ml Medium auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

7.1.4. Gewinnung von murinem Knochenmarksmakrophagen

Murine Knochenmarksmakrophagen wurden aus dem Femur und der Tibia von Mäusen isoliert. Die Knochen wurden gereinigt, mit 70 % Ethanol desinfiziert und im Anschluss an einen Waschschrift mit RPMI-Medium, mit Hilfe eines Mörsers zerkleinert. Die Zellen wurden auf einen „cell strainer“ (70 µm) pipettiert und bei 150 g für 10 min zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen dann entweder bei -80°C (in FCS mit 10 % DMSO) in Kryotubes weggefroren (Zelldichte: 1×10^7) oder zur Weiterverwendung in 10 ml Kulturmedium in Optilux™ Petri-Schalen ausgesät.

7.1.5. Kultivierung muriner Knochenmarksmakrophagen

Die isolierten und in Platten ausgesäten Makrophagen wurden mit einer Zugabe von 10 ml Anzuchtmedium nach dem 4. Tag 7-10 Tage bei 37°C inkubiert und anschließend mit eiskaltem PBS/EDTA (2 mM) abgelöst, gewaschen und nach der Auszählung in einer Zelldichte von 4×10^5 /ml in das gewünschte Zellkulturformat (6-/24-/12/-well) ausplattiert.

7.2. Bakterienkultur

7.2.1. Chlamydien-Anzucht

Angezüchtete HEp-2-Zellen wurden mit den Verdünnungen 1:50 und 1:200 mit CWL029 infiziert und anschließend 60 min bei 800 g und 37°C zentrifugiert. Es erfolgte eine Inkubation im Brutschrank bei 37°C für 3-4 Tage. Die infizierten Zellen wurden dann von der Kulturflaschenoberfläche abgeschabt und in 50 ml Gefäßen mit 7,5 ml Glasperlen bei -80°C eingefroren.

7.2.2. Chlamydien-Aufreinigung

Die aufgetauten Chlamydien-Kulturen wurden, zur Zerstörung der HEp-2-Zellen 5 min unter Beimischung von Glasperlen kräftig geschüttelt. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch 5 minütige Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand wurde wiederum bei 4°C 1 h bei 20000 g zentrifugiert. Die Resuspendierung des entstandenen Zellpellets erfolgte in 1 ml SPG-Puffer. Anschließend wurden die Proben in Kryoröhrchen zu je 100 µl pipettiert. Die Lagerung der Chlamydien erfolgte bei -80°C.

7.2.3. Chlamydien-Anfärbung mittels eines FITC-markierten Antikörpers

In einer 24-well-Platte wurden entsprechende Zellen mit Chlamydien infiziert. Nach einer Inkubationszeit von 24 h erfolgte die Anfärbung der Chlamydien einschließlich der infizierten Zellen mit einem FITC-markierten Antikörper. Nach dem Absaugen des Mediums wurden ca. 200 µl eines Methanol-Aceton-Gemisches (1:1, gelagert bei -20°C) auf Glasplättchen (in 24 -

well-Platten) hinzupipettiert. Anschließend erfolgte eine 10 minütige Inkubation bei -20°C . Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden 20 μl eines FITC-markierten anti-c(chlamydiales-) LPS-Antikörpers (DAKO, Imagen; 1:50 in 0,01 % Evans-Blau-Lsg. + 0,1 % FCS) auf die Plättchen pipettiert und wiederum 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach 2 Waschschritten mit PBS erfolgte eine Phalloidin-Färbung der Zellen und anschließend eine Fixierung der Proben mit Eindeckelmedium auf einem Objektträger.

7.2.4. Chlamydien-Anfärbung mittels eines nicht markierten Antikörpers

In einer 24-well-Platte wurden die zuvor auf Glasplättchen ausgesäten Zellen mit Chlamydien infiziert. Nach einer Inkubationszeit erfolgte die Anfärbung der Chlamydien. Nach dem Absaugen des Mediums wurden zur Fixierung der Zellen ca. 200 μl 3 % PFA (Paraformaldehyd in Verdünnungsmedium) auf die Glasplättchen (in 24-well-Platten) pipettiert und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgten drei Waschschrritte für jeweils fünf Minuten mit PBS. Eine Permeabilisierung der Zellen wurde mit 1 % Triton für 15 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend erfolgten erneut drei Waschschrritte mit PBS. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde eine Inkubation für 30 min. mit 5 % Ziegenerum durchgeführt. Für die Färbung der Chlamydien wurde zunächst ein monoklonaler Mausantikörper der Firma Santa Cruz verwendet (*C. pneumoniae* (165): sc-57665). Dieser wurde in einer Verdünnung von 1:50 (in Verdünnungsmedium) für eine Stunde auf die Zellen gegeben. Nach erneuten Waschschrritten wurde der fluoreszenzmarkierte (goat anti-mouse ALEXA FLUOR 488) Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Zellen pipettiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte dann eine Fixierung der Proben mit Eindeckelmedium auf dem Objektträger.

7.2.5. Stimulation von HUVEC-Zellen mit *C. pneumoniae*

Für die Stimulationsversuche mit HUVEC-Zellen wurden konfluente T75-Kulturflaschen mit 5×10^6 Zellen in 2 bis 4 Tagen herangezchtet und mit Chlamydien infiziert. Hierzu wurden die Zellkulturplatten 30 min bei 800 g und 37°C zentrifugiert. Es wurden unterschiedliche MOIs verwendet (0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10) oder eine Zeitreihe durchgeführt (0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 8 h, 24 h, 48 h).

7.2.6. Chlamydien-Inaktivierung

Für eine Hitzeinaktivierung der Chlamydien wurden diese 10 min bei 90°C inkubiert, eine Inaktivierung durch UV-Strahlung erfolgte für 10 bzw. 30 min mit einem Crosslinker der Firma Hoefer (UVC500, 5 x 8W 254 nm UV) bei 800 µJ/cm².

7.2.7. Reinfektionsexperimente in HEp-2-Zellen

Im Rahmen der Reinfektionsexperimente in HEp-2-Zellen wurden unbehandelte und mit *C. pneumoniae*-infizierte Zellen mit PBS gewaschen, im Medium abgelöst und 5min mit Glaskügelchen gevortext. Die so entstandenen Zelllysate inklusive der freigesetzten Bakterien wurden zur Abtrennung der Zelltrümmer zentrifugiert (500 g) und anschließend für eine Infektion der auf Glasplättchen ausgesäten HEp-2-Zellen verwendet (10 % des Überstandes). Nach 48 h Infektion wurden die Zellen mit PFA fixiert und wie oben beschrieben mit einem Antikörper gegen chlamydiales LPS inkubiert. Anschließend erfolgte eine Auszählung der chlamydialen Einschlusskörper mit Hilfe des konfokalen Laserscanmikroskopes.

7.3. Molekularbiologische Arbeitsmethoden

7.3.1. RNA-Isolation (RNeasy®, Qiagen; PerfectPure RNA Tissue Kit, 5'prime)

Für die Isolation der Gesamt-RNA wurde das Medium über den Zellen abgesaugt und es erfolgte ein Waschschrift mit PBS. Das Ablösen der Zellen wurde in 700 µl Lysepuffer RLT (RNeasy®, Qiagen; Hilden) + 1 % β-Mercaptoethanol, bzw. in 400 µl Lysepuffer (PerfectPure RNA Tissue Kit, 5'prime; Hamburg) mit einem Zellscraper durchgeführt. Die RNA-Isolation erfolgte dann mit Hilfe der Kits inklusive eines DNA-Verdaus, je nach Angaben des Herstellers. Die RNA wurde in 30 bis 80 µl Puffer eluiert und zur Konzentrationsbestimmung bei 260 nm in einer Verdünnung von 1:100 im Spektralphotometer gemessen. Die entstandene Gesamt-RNA wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bis zur Verwendung bei –80°C gelagert.

7.3.2. RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion)

Die Umschreibung der gesamten isolierten RNA in cDNA erfolgte mit dem „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ der Firma Applied Biosystems nach Angaben des Herstellerprotokolls.

Die Umschreibung der isolierten Chlamydien-RNA erfolgte mit dem „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ der Firma Applied Biosystems nach Angaben des Herstellerprotokolls unter Verwendung eines Chlamydien-spezifischen primers (16srRNA: 5'-ACCTTCCGGTAGGGCTACCTT-3').

7.3.3. Semiquantitative RT-PCR

Die gewonnene cDNA wurde mit Hilfe einer Polymerasekettenreaktion in einem Cycler spezifisch amplifiziert. Für diese Reaktion wurden folgende Komponenten verwendet:

Komponente	Volumen für eine Probe	Endkonzentration
10 x Red Taq PCR Puffer (Sigma)	15 µl	1 x
dNTP Mix (Promega)	0,5 µl	200 µm
10µM Primer Fw	0,25 µl	500 nM
10µM Primer Rv	0,25 µl	500 nM
cDNA	5 µl	
1U Red Taq TM DNA Polymerase (Sigma)	1,0 µl	1,6 U
A. bidest	Auf 25 µl auffüllen	

Der Programmablauf der semiquantitativen PCR setzte sich wie folgt zusammen:

Schritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung	94°C	3 min
Denaturierung	94°C	1 min
Hybridisierung	variabel ^a	1 min
Polymerisation	72°C	1 min
Extension	72°C	5 min

7.3.4. Agarose-Gelelektrophorese und Gel-Dokumentation der semiquantitativen RT-PCR

Die verschieden großen DNA-Fragmente wurden in einem Agarosegel nach Ihrer Größe aufgetrennt und durch Zusatz von Ethidiumbromid (1 µg/ml; Interkalierung zwischen benachbarten Basenpaaren der DNA) anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht. Es wurden 1,5 %ige Agarosegele verwendet. Zum Lösen der Agarose in 1x TAE-Puffer wurde der Ansatz in der Mikrowelle aufgeköcht bis keine Schlieren mehr sichtbar waren. Nach kurzem Abkühlen wurde Ethidiumbromid hinzu gegeben und das noch flüssige Gel in eine speziellen Elektrophorese-Kammer gegossen und auspolymerisiert. Es wurden 12 µl des Ladepuffers inklusive des PCR-Produktes sowie 5 µl eines Größenstandards (100 bp Marker, Roth, Karlsruhe) aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1 x TAE- Puffer bei 100 V (konstant) für circa eine halbe Stunde.

7.3.5. Quantitative PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Quantitative PCR (TaqMan®)

Für die quantitative PCR wurde das 7300 Real Time PCR System genutzt. TaqMan® Gene Expression Assays der Firma Applied Biosystems für IFNβ, NLRX1, ASC und GAPDH wurden verwendet um die cDNA zu amplifizieren. Die mRNA-Expression jedes Gens wurde an die

mRNA-Expression von GAPDH angeglichen. Jede Probe setzte sich folgendermaßen zusammen:

Reagenz	Menge der verwendeten Reagenzien (μl/ Ansatz; Gesamtvolumen 20μl)
TaqMan® Gene Expression Master Mix (2x)	10 μ l
TaqMan® Gene Expression Assays-on-Demand (20 μ M)	0,5 μ l
Nuklease-freies Wasser	4,5 μ l
cDNA (Probe)	5 μ l

Die quantitative PCR verlief unter den folgenden Bedingungen: 50°C 2 min, 95°C 10 min, 40 x (95°C 15 s, 60°C 1 min). Zur Auswertung wurde die 7300 System Sequence Detection Software Version 1.4 verwendet.

Folgende TaqMan® Gene Expression Assays-on-Demand (20 μ M) von Applied Biosystems wurden verwendet: hIFN β , mIFN β , hGAPDH, mGAPDH, mIL-1 β , mIL-6, IL-8, mKC, NLRX1 und ASC.

Quantitative PCR (SYBR® Green PCR)

Für die quantitative PCR wurde das 7300 Real Time PCR System mit Hilfe eines SYBR® Green PCR Master Mix der Firma Applied Biosystems verwendet. Jede Probe setzte sich folgendermaßen zusammen:

Reagenz	Menge der verwendeten Reagenzien (μ l/ Ansatz; Gesamtvolumen 20 μ l)
SYBR green Master Mix (2x)	10 μ l
Primer (stock: 10 μ M)	0,2 μ l
Nuklease-freies Wasser	4,6 μ l
cDNA (Probe)	5 μ l

7.3.6. Transfektion (Nukleofektion mittels Amaxa™ Nucleofector™)

Die Transfektion der HUVEC-Zellen mit siRNA wurde mit dem HUVEC Nucleofector Kit der Firma Amaxa (Lonza AG) durchgeführt. Vorbereitend wurden 75 cm² Kulturflaschen mit HUVEC-Zellen angezüchtet. Die 80 bis 90 % konfluenten Zellen wurden mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend trypsiniert. Die Reaktion wurde mit 15 bis 20 ml HUVEC-Kulturmedium +1 % ECGM abgestoppt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in Suspension mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die optimale Zellzahl für die Nukleofektion liegt bei 1×10^6 /100 μ l. Eine entsprechende Menge der Zellsuspension wurde bei 1200 rpm 5 min pelletiert. Für den Transfektionsvorgang wurde das Zellpellet in 100 μ l Nucleofector™ Solution resuspendiert und 2 μ g siRNA (Kontrolle und Ziel-siRNA) hinzupipettiert. Die Transfektion erfolgte in sterilen Nukleofektionsküvetten nach Angaben des Herstellers. Anschließend wurde der Transfektionsansatz in vorgewärmtes Zellmedium gegeben und in vorbereiteten Kulturflaschen bei 37°C im Brutschrank angezüchtet.

7.3.7. Transfektion (Lipofektion mittels HiPerFect® Transfektionsreagenz)

Weitere Transfektionsversuche mit HUVEC-Zellen wurden mit dem Kit „HiPerFect® Transfection Reagent“ der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers (Protokoll für adhärenz Zellen in 24-well-Platten) durchgeführt und anschließend 48 h bei 37°C im Brutschrank bis zur Infektion inkubiert.

7.4. Proteinbiochemische Methoden

7.4.1. Proteinextraktion und Proteinbestimmung

Für die Proteinextraktion wurden die Zellen nach der Stimulation auf Eis mit kaltem Phosphoprotein-Waschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur Verwendung bei –80°C gelagert. 5 µl der so gewonnenen Proben wurden jeweils für die Proteinbestimmung nach Bradford eingesetzt. Die Bradford-Bestimmung erfolgte gemäß Herstelleranleitung (BioRad, München). Die photometrische Messung wurde bei 595 nm durchgeführt, welches das Absorptionsmaximum der proteingebundenen anionischen Form des Bradford-Farbstoffes an aromatische und basische Aminosäurereste darstellt.

7.4.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine wurden auf ein 13 %iges SDS-Gel aufgetragen und es konnte mit einem rekombinanten Proteinmarker anhand der Proteinauftrennung eine Größenbestimmung erfolgen. Dafür wurden die Glasplatten in eine Gießvorrichtung eingespannt und das Trenngel eingefüllt. Zum luftdichten Abschließen des Gels wurde eine Schicht Aqua dest. aufgetragen, die nach dem Auspolymerisieren wieder abgegossen wurde. Als oberste Schicht wurde ein Sammelgel gegossen, in welches Kämme eingeführt wurden, die als Platzhalter für 10 Geltaschen dienten. Nachdem auch das Sammelgel polymerisiert war, wurden die Glasplatten mit den Gelen in die Elektrophoresekammer eingespannt. Der Raum zwischen den Glasplatten wurde mit Gelelektrophoreselaufpuffer aufgefüllt und die Kämme vorsichtig gezogen. Vor dem Auftragen der Proteine auf das Gel wurden die Proben im Verhältnis 1:1 mit Gelladepuffer versetzt und 5 min bei 95°C unter Schütteln erhitzt. Jeweils 40 bis 150 µg Gesamtprotein wurde nach dem

Abkühlen der Probe separat in je eine Geltasche aufgetragen. Ein Proteinmarker lief zur Größenkontrolle in jedem Gel parallel mit. Die Proben liefen für 1 bis 2 h im Gel bei einer Spannung von 100 V.

7.4.3. Immunoblot

Das SDS-Gel wurde nach erfolgter Elektrophorese aus der Elektrophoresekammer entnommen und luftblasenfrei auf eine Hybond-Nitrozellulosemembran aufgelegt. Um die Trenngel-Membranvorrichtung wurde ein Sandwich gebildet, in dem zwei puffergetränkte Lagen 3M-Whatman-Filterpapiere je Seite und die Blotvorrichtung gemäß Herstellerangaben verwendet wurden. Zum Proteintransfer wurde das Sandwich in die Blotkammer eingesetzt und zusammen mit eiskaltem Blotpuffer bei 100 V und 4 °C für 1 h geblottet. Um den erfolgreichen Transfer zu beurteilen, wurde die Membran reversibel mit Ponceau-S gefärbt. Anschließend wurde die Membran mit A. bidest. gewaschen, bis das Ponceau-S vollständig entfernt war.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde die Nitrozellulosemembran mit Blockpuffer 1 h bei Raumtemperatur unter leichten Schwenkbewegungen inkubiert. Danach wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem entsprechenden primären Antikörper in Licor-Blockpuffer (1:1 in PBS) inkubiert. Nach dreimaligem, jeweils fünfminütigem Waschen (PBS + 0,1 % Tween20) wurde für 1 h bei Raumtemperatur ein gegen die Spezies des primären Antikörpers gerichteter sekundärer Antikörper eingesetzt. Die sekundären Antikörper wurden 1:2000 in Blockpuffer verdünnt. Die sekundären Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit PBS + 0,1 % Tween20 und ein einmaliges Waschen mit PBS von der Blotmembran entfernt. Die am primären Antikörper gebundenen mit IRDye800 oder Cy5.5 markierten sekundären Antikörper wurden mit einem speziellen lasergestützten Detektionssystem (Odyssey Infrared Imaging System) detektiert und mit einer entsprechenden Software nach den Herstellervorgaben bearbeitet.

7.4.4. Vorbehandlung von HUVECS mit humanem rekombinantem IFN β

In 24-well-Platten wurden zu Beginn des Versuchs HUVEC mit 80 bis 95 %iger Konfluenz herangezüchtet. In Endothel-Basal-Medium mit 5 % FCS erfolgte dann die Hinzugabe von rekombinantem humanem Interferon IFN β 1b (rhIFN β 1b) in einer Verdünnung von 1: 6400 (1000

IU). Jeweils 500 µl des so angereicherten Mediums wurden dann auf die Zellen gegeben. In einer Verdünnung von 1:540 erfolgte im Anschluss noch die Zugabe von rhIFNβ1a in jedes well. Nach 16 h Inkubationszeit konnten die Zellen mit verschiedenen MOIs von *C. pneumoniae* (MOI 0, 0,25, 0,5, 1, 2) infiziert werden.

7.4.5. IFNβ ELISA

Der IFNβ-ELISA wurde nach Herstellerangaben (Human Interferon-β (HuIFNβ)-ELISA Kit-Fujirebio INC, Tokyo) durchgeführt. Im Anschluss an die Infektion mit einer MOI von 3 in 24-well-Platten konfluenten HUVEC erfolgte eine Zentrifugation bei 37°C und 800 rpm für eine Stunde. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden jeweils 100 µl der Mediumüberstände entnommen und nach weiteren 24 h wurde der gesamte Überstand abgenommen. Jeweils 100 µl wurden dann für den ELISA eingesetzt.

7.4.6. Konfokalmikroskopie

Die auf Glasplättchen in 24-well-Zellkulturschalen ausgesäten Zellen wurden nach Ablauf der Stimulationszeit zweimal mit PBS gewaschen, mit 200 µl/well 3 %igem PFA 20 min bei Raumtemperatur fixiert und nach dreimaligem Waschen mit PBS für 5 min mit 1 %igem Triton (200 µl/well) 15 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen erneut dreimal 5 min mit PBS gewaschen und mit 5%igem Ziegen Serum (200 µl/well) 30 min bei Raumtemperatur geblockt. Zum Färben der Proteine wurden der primäre Antikörper (200 µl/well) in einer entsprechenden Verdünnung in die Wellen pipettiert und 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem, jeweils fünfminütigem Waschen mit PBS wurde ein, gegen die Spezies des primären Antikörpers gerichteter, sekundärer Antikörper in einer Verdünnung von 1:8000 bis 1:10000 eingesetzt. Der sekundäre Antikörper wurde, durch dreimaligem waschen mit PBS entfernt und bei Bedarf, zur Abfärbung des zellulären Aktins mit Phalloidin ALEXA Fluor 546 (200 µl/well) in einer Verdünnung von 1:400 für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift mit PBS wurden die Glasplättchen auf Objektträger mit Eindeckelmedium fixiert und bis zum Mikroskopieren, mit Hilfe eines konfokalen Laserscanmikroskops, bei 4°C gelagert.

7.4.7. Messung intrazellulärer Sauerstoffradikale

Die Messung gebildeter Sauerstoffradikale erfolgte unter anderem mit Hilfe der quantitativen Chemolumineszenz in einem Luminometer. Die abgelösten Zellen wurden hierfür mit 10 mM Luminol und einer Einheit HRP (engl.: „horse raddish poeroxidase“) pro gemessener Probe versetzt und nach 5 s Inkubation im Luminometer gemessen. Die Angabe der Lumineszenz erfolgte in RLU (engl.: „relative light units“).

Die Messung intrazellulärer Sauerstoffradikale erfolgte mit Hilfe des „Reactive Oxygen Species (ROS) Detection Reagents“ nach Angaben des Herstellers (Molecular probes®, Invitrogen). Die Zellen wurden für 30 min mit 5 μ M H₂DCFDA in PBS bei 37 °C inkubiert mit Hilfe von Trypsin, bzw. PBS/EDTA abgelöst, und anschließend zentrifugiert und in FACS-Puffer (1 % FCS, 1 mM EDTA in PBS) resuspendiert. Mit Hilfe eines Durchflußzytometers wurde nachfolgend die Fluoreszenzintensität gemessen. Die Auswertung der ROS-Messung erfolgte mit Hilfe des FACS-Analyse-Programms Flow Jo.

Für die Bestimmung der mitochondrialen Superoxide wurde das Kit MitoSOX™ (engl.: „Red mitochondrial superoxide indicator“; Molecular probes®, Invitrogen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Zellen wurden für 10 min. mit 5 μ M MitoSOX™ in PBS inkubiert, anschließend gewaschen und mit Hilfe von Trypsin oder EDTA abgelöst. Die anschließend zentrifugierten Zellen wurden in FACS-Puffer resuspendiert und durchflußzytometrisch analysiert. Eine weitere Färbung für 10 min mit 5 μ M Mitotracker green FM (Molecular probes®, Invitrogen) ermöglichte die Kontrolle der ausschließlichen Analyse von mitochondrial gebildeten Superoxiden.

8. Literaturverzeichnis

- Aachoui Y, Leaf IA, Hagar JA, Fontana MF, Campos CG, Zak DE, Tan MH, Cotter PA, Vance RE, Aderem A, Miao EA. Caspase-11 protects against bacteria that escape the vacuole. *Science*. 2013 Feb 22; 339(6122):975-8.
- Abdullah Z, Schlee M, Roth S, Mraheil MA, Barchet W, Böttcher J, Hain T, Geiger S, Hayakawa Y, Fritz JH, Civril F, Hopfner KP, Kurts C, Ruland J, Hartmann G, Chakraborty T, Knolle PA. RIG-I detects infection with live *Listeria* by sensing secreted bacterial nucleic acids. *EMBO J*. 2012 Nov 5;31(21):4153-64.
- Abdul-Sater AA, Koo E, Hacker G, Ojcius DM. Inflammasome-dependent caspase-1 activation in cervical epithelial cells stimulates growth of the intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis*. *J Biol Chem* 2009 284: 26789–26796.
- Abdul-Sater AA, Saïd-Sadier N, Lam VM, Singh B, Pettengill MA, Soares F, Tattoli I, Lipinski S, Girardin SE, Rosenstiel P, Ojcius DM. Enhancement of reactive oxygen species production and chlamydial infection by the mitochondrial Nod-like family member NLRX1. *J Biol Chem*. 2010 Dec 31;285(53):41637-45.
- Abdul-Sater AA, Grajkowski A, Erdjument-Bromage H, Plumlee C, Levi A, Schreiber MT, Lee C, Shuman H, Beaucage SL, Schindler C. The overlapping host responses to bacterial cyclic dinucleotides. *Microbes Infect*. 2012 14:188–197
- Ablasser A, Bauernfeind F, Hartmann G, Latz E, Fitzgerald KA, Hornung V. RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol* 2009 10:1065–1072
- Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K., and Akira, S.. Targeted disruption of the MyD88 gene results in Loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 1998 9, 143.
- Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J. NALP3 forms an IL-1 β -processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity*. 2004 Mar;20(3):319-25.
- Akira et al., S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol*. 2004 4, 499–511
- Allen IC, Scull MA, Moore CB, Holl EK, McElvania-TeKippe E, Taxman DJ, Guthrie EH, Pickles RJ, Ting JP. The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity* 2009 30: 556-6
- Allen IC, Moore CB, Schneider M, Lei Y, Davis BK, Scull MA, Gris D, Roney KE, Zimmermann AG, Bowzard JB, Ranjan P, Monroe KM, Pickles RJ, Sambhara S, Ting JP. NLRX1 protein attenuates inflammatory responses to infection by interfering with the RIG-I-MAVS and TRAF6-NF- κ B signaling pathways. *Immunity*. 2011 Jun 24;34(6):854-65.

Al-Younes, H. M., Rudel, T. & Meyer, T. F.. Characterization and intracellular trafficking pattern of vacuoles containing *Chlamydia pneumoniae* in human epithelial cells. Cell Microbiol 1999 1, 237–247

Al-Younes HM, Al-Zeer MA, Khalil H, Gussmann J, Karlas A, Machuy N, Brinkmann V, Braun PR, Meyer TF. Autophagy-independent function of MAP-LC3 during intracellular propagation of *Chlamydia trachomatis*. Autophagy. 2011 Aug;7(8):814-28.

Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. Recognition of double stranded RNA and activation of NF-[kappa]B by Toll-like receptor 3. Nature 2001 413, 732.

Al-Zeer MA, Al-Younes HM, Braun PR, Zerrahn J, Meyer TF. IFN-gamma-inducible Irga6 mediates host resistance against *Chlamydia trachomatis* via autophagy. PLoS One. 2009 4(2):e4588.

Al-Zeer MA, Al-Younes HM, Lauster D, Abu Lubad M, Meyer TF. Autophagy restricts *Chlamydia trachomatis* growth in human macrophages via IFNG-inducible guanylate binding proteins. Autophagy. 2013 Jan;9(1):50-62.

Arnold FW, Summersgill JT, Lajoie AS, et al; Community-Acquired Pneumonia Organization (CAPO) Investigators. A worldwide perspective of atypical pathogens in community-acquired pneumonia. Am J Respir Crit Care Med 2007; 175 (10) 1086-1093

Arnoult D, Soares F, Tattoli I, Castanier C, Philpott DJ, Girardin SE. An N-terminal addressing sequence targets NLRX1 to the mitochondrial matrix. J Cell Sci. 2009 Sep 1;122(Pt 17):3161-8.

Aubry C, Corr SC, Wienerroither S, Goulard C, Jones R, Jamieson AM, Decker T, O'Neill LA, Dussurget O, Cossart P. Both TLR2 and TRIF contribute to interferon- β production during *Listeria* infection. PLoS One. 2012;7(3):e33299.

Auerbuch, V., D.G. Brockstedt, N. Meyer-Morse, M. O'Riordan, and D.A. Portnoy. Mice lacking the type I interferon receptor are resistant to *Listeria monocytogenes*. J. Exp. Med. 2004 :527–533.

Azad AF, Beard CB. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. Emerg Infect Dis 1998;4:179-86

Azenabor AA, Mahony JB. Generation of reactive oxygen species and formation and membrane lipid peroxides in cells infected with *Chlamydia trachomatis*. Int J Infect Dis. 2000; 4(1):46-50.

Bao Y, Han Y, Chen Z, Xu S, Cao X: IFN-alpha-producing PDCA-1(+) Siglec-H(S) B cells mediate innate immune defense by activating NK cells. Eur J Immunol 2011, 41:657-668

Barker JR, Koestler BJ, Carpenter VK, Burdette DL, Waters CM, Vance RE, Valdivia RH. STING-Dependent Recognition of Cyclic di-AMP Mediates Type I Interferon Responses during *Chlamydia trachomatis* Infection. MBio. 2013 Apr 30;4(3). pii: e00018-13.

Beatty WL, Byrne GI, Morrison RP. Repeated and persistent infection with Chlamydia and the development of chronic inflammation and disease. Trends in Microbiology 1994 2, 94-98

Beckett EL, Phipps S, Starkey MR, Horvat JC, Beagley KW, Foster PS, Hansbro PM. TLR2, but not TLR4, is required for effective host defence against *Chlamydia* respiratory tract infection in early life. PLoS One. 2012;7(6):e39460.

Bekpen C, Hunn JP, Rohde C, Parvanova I, Guethlein L, Dunn DM, Glowalla E, Leptin M, Howard JC. The interferon-inducible p47 (IRG) GTPases in vertebrates: Loss of the cell autonomous resistance mechanism in the human lineage. Genome Biol. 2005; 6(11):R92.

Bezbradica, J. J. & Medzhitov, R. Integration of cytokine and heterologous receptor signaling pathways. Nature Immunol. 2009 10, 333–339.

Bieger CD, Nierlich DP. Distribution of 5'-triphosphate termini on the mRNA of *Escherichia coli*. J Bacteriol 1989 171:141–147

Billmann-Born S, Lipinski S, Böck J, Till A, Rosenstiel P, Schreiber S. The complex interplay of NOD-like receptors and the autophagy machinery in the pathophysiology of Crohn disease. Eur J Cell Biol. 2011 Jun-Jul;90(6-7):593-602. Review.

Birmingham, C.L., Smith, A.C., Bakowski, M.A., Yoshimori, T., and Brumell, J.H. Autophagy controls *Salmonella* infection in response to damage to the *Salmonella*-containing vacuole. J Biol Chem 2006 281: 11374–11383.

Biron CA. Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN-alpha/beta), in innate and adaptive immune responses to viral infections. Semin Immunol. 1998 Oct;10(5):383-90. Review.

Block, K. , Gorin, Y. & Abboud, H. E. Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes. Proc. Natl Acad. Sci. USA 2009 106, 14385–14390

Bogdan C, Mattner J, Schleicher U. The role of type I interferons in non-viral infections. Immunological Reviews 2004 202, 33–48

Bokoch GM and Knaus UG. NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! Trends Biochem Sci 2003 28 502–508

Bortoluci und Medzhitov. "Control of infection by pyroptosis and autophagy: role of TLR and NLR Cell". Biomedical & Life Sciences 2010 67: 1643–1651

Bouchonnet,F., Boechat,N., Bonay,M., and Hance,A.J. Alpha/beta interferon impairs the ability of human macrophages to control growth of *Mycobacterium bovis* BCG. Infect. Immun. 2002 70, 3020-3025.

Brade L, Holst O, Kosma P, Zhang YX, Paulsen H, Krausse R, Brade H. Characterization of murine monoclonal and murine, rabbit, and human polyclonal antibodies against chlamydial lipopolysaccharide. Infect Immun. 1990 Jan;58(1):205-13.

Brodsky IE, Medzhitov R. Targeting of immune signaling networks by bacterial pathogens. Nat Cell Biol 2009; 11:521-6

Buchholz KR, Stephens RS The cytosolic pattern recognition receptor NOD1 induces inflammatory interleukin-8 during *Chlamydia trachomatis* infection. Infect Immun 2008 76: 3150–3155.

Bukholm G, Berdal BP, Haug C, Degré M. Mouse fibroblast interferon modifies Salmonella typhimurium infection in infant mice. Infect Immun. 1984 Jul;45(1):62-6.

Bulut Y, Faure E, Thomas L, Karahashi H, Michelsen KS, Equils O, Morrison SG, Morrison RP & Ardit M. Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway. J Immunol 2002 168: 1435–1440.

Bulut Y, Shimada K, Wong MH, Chen S, Gray P, Alsabeh R, Doherty TM, Crother TR & Ardit M Chlamydial heatshock protein 60 induces acute pulmonary inflammation in mice via the Toll-like receptor 4- and MyD88-dependent pathway. Infect Immun 2009 77: 2683–2690.

Burdette DL, Monroe KM, Sotelo-Troha K, Iwig JS, Eckert B, Hyodo M, Hayakawa Y, Vance RE. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. Nature. 2011 Sep 25;478(7370):515-8.

Bürkstümmer T, Baumann C, Blüml S, Dixit E, Dürnberger G, Jahn H, Planyavsky M, Bilban M, Colinge J, Bennett KL, Superti-Furga G. An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. Nat Immunol. 2009 Mar;10(3):266-72.

Burdette DL, Monroe KM, Sotelo-Troha K, Iwig JS, Eckert B, Hyodo M, Hayakawa Y, Vance RE. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. Nature. 2011 Sep 25;478(7370):515-8.

Burns, K., Martinon, F., Esslinger, C., Pahl, H., Schneider, P., Bodmer, J. L., Di Marco, F., French, L., and Tschopp, J.. MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. J. Biol. Chem. 1998 273, 12203.

Buss C, Opitz B, Hocke AC, Lippmann J, van Laak V, Hippenstiel S, Krüll M, Suttorp N, Eitel J. Essential role of mitochondrial antiviral signaling, IFN regulatory factor (IRF)3, and IRF7 in *Chlamydomonas pneumoniae*-mediated IFN β , et a response and control of bacterial replication in human endothelial cells. J Immunol. 2010 Mar 15;184(6):3072-8

Caldwell, H. D., J. Kromhout, and J. Schachter. Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. Infect. Immun. 1981 31:1161-1176.

Campbell LA, Puolakkainen M, Lee A, Rosenfeld ME, Garrigues HJ, Kuo CC. *Chlamydia pneumoniae* binds to the lectin-like oxidized LDL receptor for infection of endothelial cells. Microbes Infect. 2012 Jan;14(1):43-9.

Caligiuri, M. Rottenberg, A. Nicoletti, H. Wigzell, G.K. Hansson, *Chlamydia pneumoniae* infection does not induce or modify atherosclerosis in mice, Circulation 2001 103 2834e2838.

Campbell, L. A., and C. C. Kuo. *Chlamydia pneumoniae*-an infectious risk factor for atherosclerosis? Nat. Rev. Microbiol. 2004 2:23-32.

Campoy E, Colombo MI. Autophagy subversion by bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol* 2009b; 335:227-50

Carabeo, R. A., Mead, D. J. & Hackstadt, T.. Golgi-dependent transport of cholesterol to the *Chlamydia trachomatis* inclusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 100, 6771–6776.

Carlin JM, Borden EC, Byrne GI. Interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity inhibits *Chlamydia psittaci* replication in human macrophages. *J Interferon Res.* 1989 Jun;9(3):329-37.

Case CL, Kohler LJ, Lima JB, Strowig T, de Zoete MR, Flavell RA, Zamboni DS, Roy CR. Caspase-11 stimulates rapid flagellin-independent pyroptosis in response to *Legionella pneumophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Jan 29;110(5):1851-6.

Cassel SL, Eisenbarth SC, Iyer SS, Sadler JJ, Colegio OR, Tephly LA, Carter AB, Rothman PB, Flavell RA, Sutterwala FS. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 105: 9035-4

Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L, Ogura Y, Kawasaki A, Fukase K, Kusumoto S, Valvano MA, Foster SJ, Mak TW, Nunez G, Inohara N. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol.* 2003 4, 702-707

Chance B, Sies H, Boveris A Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979 59:527–605

Charrel-Dennis M, Latz E, Halmen KA, Trieu-Cuot P, Fitzgerald KA, Kasper DL, Golenbock DT. TLR-independent type I interferon induction in response to an extracellular bacterial pathogen via intracellular recognition of its DNA. *Cell Host Microbe.* 2008 Dec 11;4(6):543-54.

Chen, Lei Lei, Chunxue Lu, Rhonda Flores, Matthew P. DeLisa, Tucker C. Roberts, Floyd E. Romesberg, Guangming Zhong Secretion of the chlamydial virulence factor CPAF requires the Sec-dependent pathway *Microbiology.* 2010 October; 156(Pt 10): 3031–3040.

ChenS., K. Shimada, W. Zhang, G. Huang, T.R. Crother, M. Ardit, IL-17A is proatherogenic in high-fat diet-induced and *Chlamydia pneumoniae* infection-accelerated atherosclerosis in mice, *J. Immunol.* 2010 185 5619e5627.

Chiliveru S, Birkelund S, Paludan SR. Induction of interferon-stimulated genes by *Chlamydia pneumoniae* in fibroblasts is mediated by intracellular nucleotide-sensing receptors. *PLoS One.* 2010 Apr 6;5(4):e10005.

Chin E, Kirker K, Zuck M, James G, Hybiske K. Actin recruitment to the *Chlamydia* inclusion is spatiotemporally regulated by a mechanism that requires host and bacterial factors. *PLoS One.* 2012;7(10):e46949.

Chiu YH, Macmillan JB, Chen ZJ RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* 2009 138:576–591

Choubey, an interferon-inducible negative regulator of cell growth, J. Biol. Regul. Homeost. Agents 2000 14 (3) 187–192. [65]

Choubey, DNA-responsive inflammasomes and their regulators in autoimmunity; Clinical Immunology (2012) 142, 223–231

Christian JG, Heymann J, Paschen SA, Vier J, Schauenburg L, Rupp J, Meyer TF, Häcker G, Heuer D. Targeting of a chlamydial protease impedes intracellular bacterial growth. PLoS Pathog. 2011 Sep;7(9)

Clausen, J. D., Christiansen, G., Holst, H. U. & Birkelund, S. *Chlamydia trachomatis* utilizes the host cell microtubule network during early events of infection. Mol Microbiol 1997 25, 441–449

Clempus RE, Griendling KK. Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. Cardiovasc Res 2006 July 15;71(2):216-25.

Clifton DR, Goss RA, Sahni SK, van Antwerp D, Baggs RB, et al. NFkappa B-dependent inhibition of apoptosis is essential for host cell survival during *Rickettsia rickettsii* infection. Proc Natl Acad Sci U S A 1998 95: 4646–4651.

Clifton DR, Fields KA, Grieshaber SS, Dooley CA, Fischer ER, et al. A chlamydial type III translocated protein is tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin. Proc Natl Acad Sci U S A 2004 101: 10166–10171

Coers, J., Vance, R.E., Fontana, M.F., and Dietrich, W.F. (2007). Restriction of *Legionella pneumophila* growth in macrophages requires the concerted action of cytokine and Naip5/IpaF signalling pathways. Cell Microbiol. 2007 Oct;9(10):2344-57

Coers J, Bernstein-Hanley I, Grotzky D, Parvanova I, Howard JC, Taylor GA, Dietrich WF, Starnbach MN. *Chlamydia muridarum* evades growth restriction by the IFN-gamma-inducible host resistance factor Irgb10. J Immunol. 2008 May 1;180(9):6237-45

Cornelis GR The type III secretion injectisome. Nat Rev Micro 2006 4: 811–825

Corrigan RM, Abbott JC, Burhenne H, Kaever V, Gründling A.. c-di-AMP is a new second messenger in *Staphylococcus aureus* with a role in controlling cell size and envelope stress. PLoS Pathog. 2011 7:e1002217.h

Cortes C, Rzomp KA, Tvinnereim A, Scidmore MA, Wikel B: *Chlamydia pneumoniae* inclusion membrane protein Cpn0585 interacts with multiple Rab GTPases. Infect Immun 2007, 75:5586-5596.

Däubener W, MacKenzie CR. IFN-gamma activated indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human cells is an antiparasitic and an antibacterial effector mechanism. Adv Exp Med Biol. 1999;467:517-24. Review.

Decker T, Muller M, Stockinger S. The ying and yang of type I interferon activity in bacterial infection. Nat Rev Immunol. 2005 5, 675-87.

de la Maza LM, Peterson EM, Goebel JM, Fennie CW, Czarniecki CW. Interferon-induced inhibition of *Chlamydia trachomatis*: dissociation from antiviral and antiproliferative effects. Infect Immun. 1985 Mar;47(3):719-22.

Denis M. Recombinant murine beta interferon enhances resistance of mice to systemic *Mycobacterium avium* infection. Infect Immun. 1991 May;59(5):1857-9.

Deniset JF, Pierce GN. Possibilities for therapeutic interventions in disrupting *Chlamydophila pneumoniae* involvement in atherosclerosis. Fundam Clin Pharmacol. 2010 Oct;24(5):607-17.

Der, S.D., Zhou,A., Williams,B.R., and Silverman,R.H.. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 1998 95, 15623-15628.

Derbigny, W. A., S. C. Hong, M. S. Kerr, M. Temkit, and R. M. Johnson. *Chlamydia muridarum* infection elicits a b interferon response in murine oviductepithelial cells dependent on interferon regulatory factor 3 and TRIF. Infect.Immun. 2007 75: 1280–1290.

Derbigny WA, Shobe LR, Kamran JC, Toomey KS, Ofner S. Identifying a role for Toll-like receptor 3 in the innate immune response to *Chlamydia muridarum* infection in murine oviduct epithelial cells. Infect Immun. 2012 Jan; 80(1):254-65

Deutsche Lungenstiftung, Informationsblatt “Lungenentzündung: Atypische Pneumonien” 2008, Märzausgabe

De Viliers WJ, Smart EJ Macrophage scavenger receptors and foam cell formation. J.Leukocyte Biol. 1999 66, 740-746

Devitt A, Lund PA, Morris AG, Pearce JH. Induction of alpha/beta interferon and dependent nitric oxide synthesis during *Chlamydia trachomatis* infection of McCoy cells in the absence of exogenous cytokine. Infect Immun. 1996 Oct;64(10):3951-6.

Dikalov, S.I. & Nazarewicz, R.R.; Angiotensin II-induced production of mitochondrial ROS: Potential mechanisms and relevance for cardiovascular disease: Antioxid. Redox Signal. 2012 Oct 1;19(10):1085-94

Diefenbach,A., Schindler,H., Donhauser,N., Lorenz,E., Laskay,T., MacMicking,J., Rollinghoff,M., Gresser,I., and Bogdan,C. Type 1 interferon (IFNalpha/beta) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. Immunity 1998 8, 77-87.

Diez B, Galdeano A, Nicolas R, Cisterna R. Relationship between the production of interferon-alpha/beta and interferon-gamma during acute toxoplasmosis. Parasitology. 1989 Aug;99 Pt 1:11-5.

Dikalov S, Griendling KK, Harrison DG. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. Hypertension 2007 April;49(4):717-27.

Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J.. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. Science 2008 320: 674-

Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, Abela GS, Franchi L, Nunez G, Schnurr M, Espevik T, Lien E, Fitzgerald KA, Rock KL, Moore KJ, Wright SD, Hornung V, Latz E. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 2010 464: 1357-6

Duncan JA, Gao X, Huang MT, O'Connor BP, Thomas CE, Willingham SB, Bergstralh DT, Jarvis GA, Sparling PF, Ting JP. *Neisseria gonorrhoeae* activates the proteinase catHEp-2sin B to mediate the signaling activities of the NLRP3 and ASC-containing inflammasome. *J Immunol* 2009 182: 6460-

Dunne A, Ejdeback M, Ludidi PL, O'Neill LA, Gay NJ. Structural complementarity of Toll/interleukin-1 receptor domains in Toll-like receptors and the adaptors Mal and MyD88. *J Biol Chem.*, 2003 278(42):41443-51.

Dunzendorfer S, Lee HK, Tobias PS: Flowdependent regulation of endothelial Toll like receptor 2 expression through inhibition of SP1 activity. *Circ Res* 2004;95: 684–691.

van Eden W, Spiering R, Broere F, van der Zee R. A case of mistaken identity: HSPs are no DAMPs but DAMPERs. *Cell Stress Chaperones*. 2012 May;17(3):281-92.

Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature*. 2008 Jun 19;453(7198):1122-6.

Eissenberg, L. G., and P. B. Wyrick. Inhibition of phagolysosome fusion is localized to *Chlamydia psittaci*-laden vacuoles. *Infect. Immun.* 1981 32:889–896.

Eitel J, Meixenberger K, van Laak C, Orlovski C, Hocke A, Schmeck B, Hippenstiel S, N'Guessan PD, Suttorp N, Opitz B. Rac1 regulates the NLRP3 inflammasome which mediates IL-1 β production in *Chlamydomonas pneumoniae* infected human mononuclear cells. *PLoS One*. 2012;7(1):e30379.

Elinav E, Strowig T, Henao-Mejia J, Flavell RA. Regulation of the antimicrobial response by NLR proteins. *Immunity*. 2011 May 27;34(5):665-79.

Erridge C, Burdess A, Jackson AJ, Murray C, Riggio M, Lappin D, Milligan S, Spickett CM, Webb DJ: Vascular cell responsiveness to Toll-like receptor ligands in carotid atheroma. *Eur J Clin Invest* 2008; 38: 713–720.

Everett KDE, Bush RM, Anderson AA: Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol* 1999 49:425-440

Fan T, Lu H, Hu H, Shi L, McClarty GA, et al. Inhibition of apoptosis in *chlamydia*-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. *J Exp Med* 1998 187: 487–496

Farris CM, Morrison RP. Vaccination against *Chlamydia* genital infection utilizing the murine *C. muridarum* model. Infect Immun. 2011 Mar;79(3):986-96.

Feici Diao, Shu Li, Yang Tian, Min Zhang, Liang-Guo Xu, Yan Zhang, Rui-Peng Wang, Danying Chen, Zhonghe Zhai, Bo Zhong, Po Tien, Hong-Bing Shu Negative regulation of MDA5- but not RIG-I-mediated innate antiviral signaling by the dihydroxyacetone kinase Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 July 10; 104(28): 11706–11711.

Feng Y, Huang N, Wu Q, Wang B. HMGN2: a novel antimicrobial effector molecule of human mononuclear leukocytes? J Leukoc Biol. 2005 Nov;78(5):1136-41.

Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Juliana C, Solorzano L, Kang S, Wu J, Datta P, McCormick M, Huang L, McDermott E, Eisenlohr L, Landel CP, Alnemri ES. The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to Francisella tularensis. Nat Immunol. 2010 11:385-393.

Fields, K. A. & Hackstadt, T. Evidence for the secretion of *Chlamydia trachomatis* CopN by a type III secretion mechanism. MolMicrobiol 2000 38, 1048–1060.

Fields, K. A. & Hackstadt, T. The chlamydial inclusion: escape from the endocytic pathway. Annu Rev Cell Dev Biol 2002 18, 221

Fields, K. A., Mead, D., Dooley, C. A. & Hackstadt, T. *Chlamydia trachomatis* type III secretion: evidence for a functional apparatus during early-cycle development. Mol Microbiol 2003 48, 671–683

Fitzgerald KA, et al. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. Nat Immunol 2003; 4:491–496.

Fitzgerald KA*, McWhirter SM, Rosains J, Rowe DC, Golenbock DT, Maniatis T. IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 101, 233-8

Fitzner,Nicole Sigrid Clauberg, Frank Essmann, Joerg Liebmann, and Victoria Kolb-Bachofen1, Human Skin Endothelial Cells Can Express All 10 TLR Genes and Respond to Respective Ligands* Clin Vaccine Immunol. 2008 January; 15(1): 138–146.

Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelialnitric oxide synthase. Am J Physiol Regul Integ Comp Physiol 2003; 284: R1–R12.

J.H. Fritz, R.L. Ferrero, D.J. Philpott, S.E. Girardin Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease Nat Immunol 2006, 7 pp. 1250–1257

Fu XY, Kessler DS, Veals SA, Levy DE, Darnell JE Jr. ISGF3, the transcriptional activator induced by interferon alpha, consists of multiple interacting polypeptide chains. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Nov;87 (21):8555-9.

Fujiki T, Tanaka A. Antibacterial activity of recombinant murine beta interferon. Infect Immun. 1988 Mar;56 (3):548-51.

Gack MU, Shin YC, Joo CH, Urano T, Liang C, Sun L, Takeuchi O, Akira S, Chen Z, Inoue S, TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature*. 2007; 446: 916–920.

Gao,J.J., Filla,M.B., Fultz,M.J., Vogel,S.N., Russell,S.W., and Murphy,W.J. Autocrine/paracrine IFN α mediates the lipopolysaccharide-induced activation of transcription factor Stat1 α in mouse macrophages: pivotal role of Stat1 α in induction of the inducible nitric oxide synthase gene. *J. Immunol*. 1998 161, 4803-4810.

Gao D, Wu J, Wu YT, Du F, Aroh C, Yan N, Sun L, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune sensor of HIV and other retroviruses. *Science*. 2013 Aug 23;341(6148):903-6.

Gaydos CA, Summersgill JT, Sahney NN, Ramirez JA, Quinn TC. Replication of *Chlamydia pneumoniae* in vitro in human macrophages, endothelial cells, and aortic artery smooth muscle cells. *Infect Immun*. 1996 64:1614 –1620.

Ghuysen JM, Goffin C. Lack of cell wall peptidoglycan versus penicillin sensitivity:, new insights into the chlamydial anomaly. *Antimicrob Agents Chemother* 1999 43:2339-44

Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac, Jehanno M, Viala J, Tedin K, Taha MK, Labigne A, Zahringer U, Coyle AJ, Distefano PS, Bertin J, Sansonetti PJ, Philpott DJ Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 2003 300, 1584–1587

Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti PJ Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem*. 2003 278, 8869-8872

Grayston JT, Kuo CC, Coulson AS, Campbell LA, Lawrence RD, Lee MJ, *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) in atherosclerosis of the carotid artery. *Circulation* 1995 92, 3397-400.

Grayston JT. Background and current knowledge of *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis. *J Infect Dis*. 2000;181 Suppl 3:S402-S410.

Gratz N, Hartweger H, Matt U, Kratochvill F, Janos M, Sigel S, Drobits B, Li XD, Knapp S, Kovarik P: Type I interferon production induced by *Streptococcus pyogenes*-derived nucleic acids is required for host protection. *PLoS Pathog* 2011, 7:e1001345.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000 March 17;86(5):494-501.

Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury. Part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 2003; 108: 1912–6.

Grieshaber, S. S., Grieshaber, N. & Hackstadt, T. *Chlamydia trachomatis* uses host cell dynein to traffic to the microtubule organizing center in a p50 dynamitin-independent process. *J Cell Sci* 2003 116, 3793–3802

Gross O, Poeck H, Bscheider M, Dostert C, Hanneschlager N, Endres S, Hartmann G, Tardivel A, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Mocsai A, Tschopp J, Ruland J. Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature* 459 2009: 433-

Gurcel L, Abrami L, Girardin S, Tschopp J, van der Goot FG. Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. *Cell*. 2006 Sep 22;126(6):1135-45.

Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell*. 2004 Dec 17;119(6):753-66.

Hacker H, et al. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* 2006;439:204–207

Hackstadt, T., Scidmore, M. A. & Rockey, D. D. Lipid metabolism in *Chlamydia trachomatis*-infected cells: directed trafficking of Golgi-derived sphingolipids to the chlamydial inclusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 92, 4877–4881

Hackstadt, T., Rockey, D. D., Heinzen, R. A. & Scidmore, M. A. *Chlamydia trachomatis* interrupts an exocytic pathway to acquire endogenously synthesized sphingomyelin in transit from the Golgi apparatus to the plasma membrane. 1996 *EMBO J* 15, 964–977

Hackstadt T, Fischer ER, Scidmore MA, Rockey DD, Heinzen RA Origins and functions of the chlamydial inclusion. *Trends Microbiol* 1997 5: 288–93.

Hahn DL, Peeling RW, Dillon E, McDonald R, Saikku P: Serologic markers for in asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 84, 227 - 233 (2000).

Hammerschlag MR. The intracellular life of *chlamydiae*. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2002 Oct; 13(4):239-48.

Hancock, J. T., O. T. Jones. The inhibition by diphenyleneiodonium and its analogues of superoxide generation by macrophages. *Biochem. J.* 242: 103–107.

Hatch, T. P. Utilization of L-cell nucleoside triphosphates by *Chlamydia psittaci* for ribonucleic acid synthesis. *J Bacteriol* 1975 122, 393–400

Hatch, T. P., D. W. Vance, Jr., and E. Al-Hossainy. Identification of a major envelope protein in *Chlamydia spp*. *J Bacteriol* 1981 146:426-9.

Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, Fitzgerald KA, Latz E, Moore KJ, Golenbock DT. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol* 2008 9: 857-6

Hayaishi O, Hirata F, Fujiwara M, Senoh S, Tokuyama T. Indoleamine 2,3-dioxygenase. Note II. Biological function. *Acta Vitaminol Enzymol*. 1975;29(1-6):291-3.

He X, Mekasha S, Mavrogiorgos N, Fitzgerald KA, Lien E, Ingalls RR. Inflammation and fibrosis during *Chlamydia pneumoniae* infection is regulated by IL-1 and the NLRP3/ASC inflammasome. J Immunol. 2010 May 15;184(10):5743-54.

Heinzen RA, Scidmore MA, Rockey DD, Hackstadt T Differential interaction with endocytic and exocytic pathways distinguish parasitophorous vacuoles of *Coxiella burnetii* and *Chlamydia trachomatis*. Infect Immun 1996 64(3): 796–809.

Hemmi H, et al. The roles of two Ikappa Girardin SE, Tournebize R, Mavris M, Page AL, Li X, Stark GR, Bertin J, DiStefano PS, Yaniv M, Sansonetti PJ, Philpott DJ CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. EMBO 2001 Rep. 8, 736-742.

Hemmi H, et al. The roles of two IkappaBkinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. J Exp Med 2004;199:1641–50

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., and Akira, S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature 2000 408, 740.

Henry, T., G.S. Kirimanjeswara, T. Ruby, J.W. Jones, K. Peng, M. Perret, L. Ho, J.D. Sauer, Y. Iwakura, D.W. Metzger, and D.M. Monack. Type I IFN signaling constrains IL-17A/F secretion by gamma delta T cells during bacterial infections. J. Immunol. 2010 184:3755–3767.

Hess CB, Niesel DW, Klimpel GR. The induction of interferon production in fibroblasts by invasive bacteria: a comparison of *Salmonella* and *Shigella* species. Microb Pathog. 1989 Aug;7(2):111-20.

Heuer D, Rejman Lipinski A, Machuy N, Karlas A, Wehrens A, Siedler F, Brinkmann V, Meyer TF. *Chlamydia* causes fragmentation of the Golgi compartment to ensure reproduction. Nature. 2009 Feb 5; 457(7230):731-5.

Higashi, N. Electron microscopic studies on the mode of reproduction of trachoma virus and psittacosis virus in cell culture. Exp. Mol. Pathol. 1965 4:24-39.

Hoebe, K. Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways. Nat. Immunol. 4, 2003 1223.

Holland JA, Pritchard KA, Pappolla MA, Wolin MS, Rogers NJ, and Stemerman MB. Bradykinin induces peroxide anion release from human endothelial cells. J Cell Physiol 143: 21–25, 1990

Honda K, et al. IRF7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. Nature 2005; 434:772–77

Honda K und Taniguchi T IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. Nature Rev Immunol. 2006 6, 644-658

Hong M, Yoon SI, Wilson IA. Structure and functional characterization of the RNA-binding element of the NLRX1 innate immune modulator. *Immunity*. 2012 Mar 23; 36(3):337-47.

Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzózka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann KK, Schlee M, Endres S, Hartmann G. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science*. 2006 Nov 10; 314(5801):994-7.

Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, Fitzgerald KA, Latz E. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol*. 2008 Aug;9(8):847-56.

Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR, Latz E, Fitzgerald KA. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature*. 2009 458:514-518.

Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide. *J Immunol*. 1999 Apr 1;162(7):3749-52.

Howard J. The IRG proteins: a function in search of a mechanism. *Immunobiology*. 2008; 213(3-4):367-75. Review.

Huang J, Liu T, Xu LG, Chen D, Zhai Z, Shu HB. SIKE is an IKK epsilon/TBK1-associated suppressor of TLR3- and virus-triggered IRF3 activation pathways. *EMBO J*. 2005 Dec 7;24(23):4018-28.

Huang, Chun-Ming Shih, Nai-Wen Tsao, Yung-Hsiang Chen, Chi-Yuan Li, Yu-Jia Chang, Nen-Chung Chang, Keng-Liang Ou, Cheng-Yen Lin, Yi-Wen Lin, Chih-Hao Nien, Feng-Yen Lin GroEL1, from *Chlamydia pneumoniae*, Induces Vascular Adhesion Molecule 1 Expression by p37AUF1 in Endothelial Cells and Hypercholesterolemic Rabbit PLoS One. 2012; 7(8): e42808.

Hunn JP, Koenen-Waisman S, Papic N, Schroeder N, Pawlowski N, Lange R, Kaiser F, Zerrahn J, Martens S, Howard JC. Regulatory interactions between IRG resistance GTPases in the cellular response to *Toxoplasma gondii*. *EMBO J*. 2008 Oct 8;27(19):2495-509.

Huntemann und Lorenz, Ambulant erworbene Pneumonie (AEP). CAPNETZ Kompetenznetz Ambulant Erworbene Pneumonie. Lüdenscheid 2004

Hybiske, K. und R.S. Stephens. Mechanisms of *Chlamydia trachomatis* entry into nonphagocytic cells. *Infect. Immun.* 2007 (a) 75:3925-3934.

Hybiske, K. und R.S. Stephens. Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium *Chlamydia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2007 (b) 104:11430-11435.

Hybiske, K. und R.S. Stephens.. Exit strategies of intracellular pathogens. *Nat Rev Micro* 2008 6:99-110.

Ichimura, Y., T. Kumanomidou, Y.-s. Sou, T. Mizushima, J. Ezaki, T. Ueno, E. Kominami, T. Yamane, K. Tanaka, and M. Komatsu. Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. *J. Biol. Chem*. 2008 283: 22847–22857

Inohara N, Koseki T, del Peso L, Hu Y, Yee C, Chen S, Carrio R, Merino J, Liu D, Ni J, Núñez G. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem*. 1999 May 21;274(21):14560-7

Inohara N, Koseki T, Lin J, del Peso L, Lucas PC, Chen FF, Ogura Y, Nunez G. An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways. *J Biol Chem* 2000 275, 27823-27831

Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M, Foster SJ, Moran AP, Fernandez-Luna JL, Nunez G Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J. Biol. Chem*. 2003 278, 5509–5512

Isaacs, A. & Lindenmann, J. Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 1957 147, 258–267

Ishii, K.J., Kawagoe, T., Koyama, S., Matsui, K., Kumar, H., Kawai, T., Uematsu, S., Takeuchi, O., Takeshita, F., Coban, C., et al. TANKbindingkinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature* 2008 451, 725–729.

Ishikawa H, Barber GN. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature*. 2008 Oct 2;455(7213):674-8.

Ishikawa H, Barber GN. The STING pathway and regulation of innate immune signaling in response to DNA pathogens. *Cell Mol Life Sci*. 2011 Apr;68(7):1157-65. Review.

Ishikawa H, Ma Z, Barber GN. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature*. 2009 Oct 8;461(7265):788-92.

Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002 ;20:197-216. Epub 2001 Oct 4. Review.

Jego G, Palucka AK, Blanck JP, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity*. 2003 Aug;19(2):225-34.

Jia Y, Song T, Wei C, Ni C, Zheng Z, Xu Q, Ma H, Li L, Zhang Y, He X, et al. Negativeregulation of MAVS-mediated innate immune response by PSMA7. *J Immunol*. 2009; 183: 4241–4248.

Johnson RM, Kerr MS, Slaven JE. Plac8-dependent and inducible NO synthase-dependent mechanisms clear *Chlamydia muridarum* infections from the genital tract. *J Immunol*. 2012 Feb 15;188(4):1896-904.

Jones, N. Kayagaki, et al., Absent in melanoma 2 is required for innate immune recognition of *Francisella tularensis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010 107 (21) 9771–9776.

Jounai N, Takeshita F, Kobiyama K, Sawano A, Miyawaki A, Xin KQ, Ishii KJ, Kawai T, Akira S, Suzuki K, Okuda K. The Atg5 Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Aug 28;104(35):14050-5.

Jungas T, Verbeke P, Darville T, Ojcius DM. Cell death, BAX activation, and HMGB1 release during infection with *Chlamydia*. *Microbes Infect.* 2004 Nov;6(13):1145-55.

Kaiko G, Horvat J, Beagley K, Hansbro P Immunological decisionmaking: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* 2008 123: 326–338.

Kalayoglu MV, Byrne GI Induction of macrophage foam cell formation by *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect. Dis* 1998 177, 725-729

Kalayoglu MV, Hoerneman B, LaVerda D, Morrison SG, Morrison RP, Byrne GI. Cellular oxidation of low-density lipoprotein by *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis.* 1999 Sep;180(3):780-90.

Kalman, S., W. Mitchell, R. Marathe, C. Lammel, J. Fan, R. W. Hyman, L. Olinger, J. Grimwood, R. W. Davis, and R. S. Stephens. Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*. *Nat Genet* 1999 21:385-389.

Kanneganti TD, Ozören N, Body-Malapel M, Amer A, Park JH, Franchi L, Whitfield J, Barchet W, Colonna M, Vandenabeele P, Bertin J, Coyle A, Grant EP, Akira S, Núñez G. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* 2006 440(7081):233-6.

Karunakaran K, Mehlitz A, Rudel T. Evolutionary conservation of infection-induced cell death inhibition among *Chlamydiales*. *PLoS One.* 2011;6(7):e22528.

Karaolis,D.K., Means,T.K., Yang,D., Takahashi,M., Yoshimura,T., Muraille,E., Philpott,D.,Schroeder,J.T., Hyodo,M., Hayakawa,Y., Talbot,B.G., Brouillette,E., and Malouin,F. Bacterial c-di-GMP is an immunostimulatory molecule. *J. Immunol.* 2007 178, 2171-2181.

Kari, L., Goheen, M. M., Randall, L. B., Taylor, L. D., Carlson, J. H., Whitmire, W. M., Virok, D., Rajaram, K., Endresz, V., McClarty, G., Nelson, D. E., and Caldwell, H. D. (2011). Generation of targeted *Chlamydia trachomatis* null mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Apr 26;108(17):7189-93.

Kato,H., Takeuchi,O., Sato,S., Yoneyama,M., Yamamoto,M., Matsui,K., Uematsu,S., Jung,A., Kawai,T., Ishii,K.J., Yamaguchi,O., Otsu,K., Tsujimura,T., Koh,C.S., Reis e Sousa, Matsuura,Y., Fujita,T., and Akira,S. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006 441, 101-105.

Kato,H., Takeuchi,O., Mikamo-Satoh,E., Hirai,R., Kawai,T., Matsushita,K., Hiiragi,A.,Dermody,T.S., Fujita,T., and Akira,S. Length-dependent recognition of doublestrandedribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiationassociated gene 5. *J Exp Med* 2008 205, 1601-1610.

Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999 11, 115.

Kawai, T., Takeuchi, O., Fujita, T., Inoue, J., Muhlradt, P. F., Sato, S., Hoshino, K., and Akira, S. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-

regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. J. Immunol. 2001 167, 5887.

Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, Ishii KJ, Takeuchi O, and Akira S. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. Nat. Immunol. 2005 6, 981–988.

Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. Nat Immunol 2010;11:373–384.

Kawai, T. & Akira, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. Immunity 2011 34, 637–650

Kerur N, Veettil MV, Sharma-Walia N, Bottero V, Sadagopan S, Otageri P, Chandran B. IFI16 acts as a nuclear pathogen sensor to induce the inflammasome in response to Kaposi Sarcoma-associated herpesvirus infection. Cell Host Microbe. 2011 May 19;9(5):363-75.

Kim JY, Ozato K. The sequestosome 1/p62 attenuates cytokine gene expression in activated macrophages by inhibiting IFN regulatory factor 8 and TNF receptor-associated factor 6/NF-kappaB activity. J Immunol. 2009 Feb 15;182(4):2131-40.

Kim, et al., NecroX as a novel class of mitochondrial reactive oxygen species and ONOO(-) scavenger.; Arch. Pharm. Res. 2010 33, 1813

Kirkinezos IG, Moraes CT. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. Semin Cell Dev Biol. 2001 Dec;12(6):449-57.

Klucken A.C., *Chlamydophila pneumoniae* – induzierte Aktivierung humaner Endothelzellen, Dissertationsschrift der med. Klinik für Infektiologie und Pneumologie der Universitätsmedizin Berlin, 2008

Kol A, Sukhova GK, Lichtman AH, Libby P. Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor- α and matrix metalloproteinase expression. Circulation 1998; 98:300-7.

Kol A, Lichtman AH, Finberg RW, Libby P, Kurt-Jones EA. Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. J Immunol. 2000 Jan 1;164(1):13-7.

Krüll M, Kramp J, Petrov T, Klucken AC, Hocke AC, Walter C, Schmeck B, Seybold J, Maass M, Ludwig S, Kuipers JG, Suttorp N, Hippenstiel S. Differences in cell activation by *Chlamydophila pneumoniae* and *Chlamydia trachomatis* infection in human endothelial cells. Infect Immun. 2004 Nov;72(11)

Kumar Y, Valdivia RH. Reorganization of the host cytoskeleton by the intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis* Commun Integr Biol. 2008;1(2):175-7.

Kumar, D. et al. Genome-wide analysis of the host intracellular network that regulates survival of *Mycobacterium tuberculosis*. Cell 2010 140, 731–743

Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*. 2011 Feb;30

Kuo CC, Gown AM, Benditt EP, Grayston JT Detection of *Chlamydia pneumoniae* in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemicalstain. *Arterioscler Thromb* 1993 13, 1501-1504.

Kuo CC*, Shor A, Campbell LA, Goo YA, Wissler RW, Benditt EP Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic lesions of coronary arteries. *J Infect Dis* 1993 167, 841-849.

Kuo CC, Jackson LA, Campbell LA and Grayston JT *Chlamydia pneumoniae* *ClinicalMicrobiology Reviews* 1995 8, 451–461

Kuo CC*, Grayston JT, Campbell LA, *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) in coronary arteries of young adults (15-34 years old). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 92, 6911-6914.

Lambeth JD.NOXenzymes and the biology of reactive oxygen.*Nat Rev Immunol* 2004;4(3):181–189.

Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003 August;285(2):R277-R297

Laurila AL, von Hertzen L, Saikku P: *Chlamydia pneumoniae* and chronic lung diseases. *Scand J Infect Dis Suppl* 1997 104, 34 - 36

Lassègue B, San Martín A, Griendling KK. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circ Res*. 2012 May 11;110(10):1364-90.

Leber,J.H., Crimmins,G.T., Raghavan,S., Meyer-Morse,N.P., Cox,J.S., and Portnoy, D.A. Distinct TLR- and NLR-mediated transcriptional responses to an intracellular pathogen. *PLoS Pathog*. 2008 4, e6.

Lei Y, Wen H, Yu Y, Taxman DJ, Zhang L, Widman DG, Swanson KV, Wen KW, Damania B, Moore CB, Giguère PM, Siderovski DP, Hiscott J, Razani B, Semenkovich CF, Chen X, Ting JP.The mitochondrial proteins NLRX1 and TUFM form a complex that regulates type I interferon and autophagy. *Immunity*. 2012 Jun 29;36(6):933-46.

Guido Kroemer, Beth Levine Autophagic cell death: the story of a misnomer *Nat Rev Mol Cell Biol*. Author manuscript; available in PMC 2009 August 14. Published in final edited form as: *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 December; 9(12): 1004–1010.

Levy D, Larner A, Chaudhuri A, Babiss LE, Darnell JE Jr. Interferon-stimulated transcription: isolation of an inducible gene and identification of its regulatory region. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Dec;83(23):8929-33.

Levy DE, Kessler DS, Pine R, Darnell JE Jr. Cytoplasmic activation of ISGF3, the positive regulator of interferon-alpha-stimulated transcription, reconstituted in vitro. *Genes Dev*. 1989 Sep;3(9):1362-71.

Li, S., Strelow, A., Fontana, E. J., and Wesche, H. IRAK-4: A novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002 99, 5567.

Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, Robinson JP. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem*. 2003 Mar 7;278(10):8516-25.

Li XD, Chiu YH, Ismail AS, Behrendt CL, Wight-Carter M, Hooper LV, Chen ZJ. Mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS) monitors commensal bacteria and induces an immune response that prevents experimental colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Oct 18;108(42):17390-5.

Li Y, Chen R, Zhou Q, Xu Z, Li C, Wang S, Mao A, Zhang X, He W, Shu HB. LSm14A is a processing body-associated sensor of viral nucleic acids that initiates cellular antiviral response in the early phase of viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jul 17;109(29):11770-5.

Lin R, Mamane Y, Hiscott J. Multiple regulatory domains control IRF7 activity in response to virus infection. *J Biol Chem*. 2000 275, 34320-34327

Linnanmaki E, Leinonen M, Mattila K, Nieminen MS, Valtonen V, Saikku P. *Chlamydia pneumoniae*—specific circulating immune complexes in patients with chronic coronary heart disease. *Circulation* 1993 ;87:1130-4.

Lippmann J, Rothenburg S, Deigendesch N, Eitel J, Meixenberger K, van Laak V, Slevogt H, N'guessan PD, Hippenstiel S, Chakraborty T, Flieger A, Suttorp N, Opitz B. IFN β responses induced by intracellular bacteria or cytosolic DNA in different human cells do not require ZBP1 (DLM-1/DAI). *Cell Microbiol*. 2008 10:2579-2588.

Lippmann J, Müller HC, Naujoks J, Tabeling C, Shin S, Witzernath M, Hellwig K, Kirschning CJ, Taylor GA, Barchet W, Bauer S, Suttorp N, Roy CR, Opitz B. Dissection of a type I interferon pathway in controlling bacterial intracellular infection in mice. *Cell Microbiol*. 2011 Nov;13(11):1668-82.

Loo YM, Gale M Jr. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity*. 2011 May 27;34(5):680-92. Review.

MacMicking JD, Taylor GA, McKinney JD. Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47. *Science*. 2003 Oct 24;302(5645):654-9.

Manca,C., Tsenova,L., Bergtold,A., Freeman,S., Tovey,M., Musser,J.M., Barry,C.E., III, Freedman,V.H., and Kaplan,G. Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN-alpha /beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2001 98, 5752-5757.

Mancuso G, Midiri A, Biondo C, Beninati C, Zummo S, Galbo R, Tomasello F, Gambuzza M, Macrì G, Ruggeri A, Leanderson T, Teti G. Type I IFN signaling is crucial for host resistance against different species of pathogenic bacteria. *J Immunol*. 2007 Mar 1;178(5):3126-33

Mancuso G, Gambuzza M, Midiri A, Biondo C, Papasergi S, Akira S, Teti G, Beninati C: Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nat Immunol* 2009, 10:587-594

Maniatis T, Falvo JV, Kim TH, Kim, TK, Lin CH, Parekh BS, and Wathlet, MG Structure and function of the interferon beta enhanceosome. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1998 63, 609–620.

Maraha B, den Heijer M, Kluytmans J, Peeters M Impact of serological methodology on assessment of the link between *Chlamydia pneumoniae* and vascular diseases. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004 11, 789-791.

Maraha B*, Berg H, Kerver M, Kranendonk S, Hamming J, Kluytmans J, Peeters M, van der Zee A. Is the perceived association between *Chlamydia pneumoniae* and vascular diseases biased by methodology? *J Clin Microbiol.* 2004 42, 3937-3941.

Marchi S, Giorgi C, Suski JM, Agnoletto C, Bononi A, Bonora M, De Marchi E, Missiroli S, Patergnani S, Poletti F, Rimessi A, Duszynski J, Wieckowski MR, Pinton P. Mitochondria-ros crosstalk in the control of cell death and aging. *J Signal Transduct.* 2012; 2012:329635. doi: 10.1155/2012/329635.

Marie I, Durbin JE, Levy DE. Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J.* 1998 17, 6660-6669

Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee WP, Weinrauch Y, Monack DM, Dixit VM. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature.* 2006 Mar 9;440(7081):228-32.

Martens, S., Parvanova, I., Zerrahn, J., Griffiths, G., Schell, G., Reichmann, G., and Howard, J.C. Disruption of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuoles by the mouse p47-resistance GTPases. *PLoS Pathog.* 2005 1, e24.

Martin, F.J., Gomez, M.I., Wetzel, D.M., Memmi, G., O'Seaghdha, M., Soong, G., et al. *Staphylococcus aureus* activates type I IFN signaling in mice and humans through the Xr repeated sequences of protein A. *J Clin Invest* 2009 119: 1931–1939

Martinon F, Agostini L, Meylan E, Tschopp J. Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. *Curr Biol.* 2004 Nov 9;14(21):1929-34.

Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature.* 2006 Mar 9;440(7081):237-41. 11.

Matsubara T and Ziff M. Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. *J Immunol* 1986 137: 3295–3298

McClarty, G. *Chlamydiae* and the biochemistry of intracellular parasitism. *Trends Microbiol* 2, 1994 157–164

McWhirter SM, Barbalat R, Monroe KM, Fontana MF, Hyodo M, Joncker NT, Ishii KJ, Akira S, Colonna M, Chen ZJ, Fitzgerald KA, Hayakawa Y, Vance RE. A host type I interferon response

is induced by cytosolic sensing of the bacterial second messenger cyclic-di-GMP. *J Exp Med*. 2009 Aug 31;206(9):1899-911.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S., and Janeway, C. A., Jr. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell* 1998 2, 253.

Medzhitov R Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol*. 2001 1, 135–145

Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007; 449:819–826

Merika, M., A. J. Williams, G. Chen, T. Collins, and D. Thanos. Recruitment of CBP/p300 by the IFN- β enhanceosome is required for synergistic activation of transcription. *Mol. Cell* 1998 1: 277–287

Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, Tschopp J. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by HEp-2atitis C virus. *Nature*. 2005 Oct 20;437(7062):1167-72.

Miao EA, Leaf IA, Treuting PM, Mao DP, Dors M, Sarkar A, Warren SE, Wewers MD, Aderem A. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat Immunol*. 2010 Dec;11(12):1136-42.

Mitchell CM, Hovis KM, Bavoil PM, Myers GSA, Carrasco JA, Timms P. Comparison of koala LPCoLN and human strains of *Chlamydia pneumoniae* highlights extended genetic diversity in the species. *BMC Genomics* 2010; 11: 442

Miyairi I, Byrne GI. *Chlamydia* and programmed cell death. *Curr Opin Microbiol*. 2006 Feb;9(1):102-8.

Mogensen KE, Lewerenz M, Reboul J, Lutfalla G, Uzé G. The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family business. *J Interferon Cytokine Res*. 1999 Oct;19(10):1069-98.

Monroe KM, McWhirter SM, Vance RE. Identification of host cytosolic sensors and bacterial factors regulating the type I interferon response to *Legionella pneumophila*. *PLoS Pathog*. 2009 Nov;5(11):e1000665

Monroe KM, McWhirter SM, Vance RE. Induction of type I interferons by bacteria. *Cell Microbiol*. 2010 Jul;12(7):881-90..Review.

Moore CB, Bergstralh DT, Duncan JA, Lei Y, Morrison TE, Zimmermann AG, Accavitti-Loper MA, Madden VJ, Sun L, Ye Z, Lich JD, Heise MT, Chen Z, Ting JP NLRX1 is a regulator of mitochondrial antiviral immunity. *Nature* 2008 31;451(7178):573-7.

Mostowy, S., V. Sancho-Shimizu, M. A. Hamon, R. Simeone, R. Brosch, T. Johansen and P. Cossart. "p62 and NDP52 proteins target intracytosolic *Shigella* and *Listeria* to different autophagy pathways." *J Biol Chem* 2011 286(30): 26987-26995.

Mostowy S. Autophagy and bacterial clearance: a not so clear picture. *Cell Microbiol.* 2013 Mar;15(3):395-402.

Moulder, J. W. Interaction of *chlamydiae* and host cells in vitro. *Microbiol Rev* 1991 55, 143–190

Mukherjee K, Parashuraman S, Krishnamurthy G, Majumdar J, Yadav A, Kumar R, Basu SK, Mukhopadhyay A. Diverting intracellular trafficking of *Salmonella* to the lysosome through activation of the late endocytic Rab7 by intracellular delivery of muramyl dipeptide. *J Cell Sci.* 2002 Sep 15;115(Pt 18):3693-701.

Muschiol S, Bailey L, Gylfe A, Sundin C, Hultenby K, Bergström S, Elofsson M, Wolf-Watz H, Normark S, Henriques-Normark B. A small-molecule inhibitor of type III secretion inhibits different stages of the infectious cycle of *Chlamydia trachomatis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Sep 26;103(39):

Muschiol S, Normark S, Henriques-Normark B, Subtil A. Small molecule inhibitors of the Yersinia type III secretion system impair the development of *Chlamydia* after entry into host cells. *BMC Microbiol.* 2009 Apr 21;9:75.

Mussa FF, Chai H, Wang X, Yao Q, Lumsden AB, Chen C. *Chlamydia pneumoniae* and vascular disease: an update. *J Vasc Surg.* 2006 43, 1301-1307

Nagarajan, U. M., D. M. Ojcius, L. Stahl, R. G. Rank, and T. Darville. *Chlamydia trachomatis* induces expression of IFN-g–inducible protein 10 and IFN-b independent of TLR2 and TLR4, but largely dependent on MyD88. *J. Immunol.* 2005 175: 450–460.

Naiki Y, Sorrentino R, Wong MH, Michelsen KS, Shimada K, Chen S, Yilmaz A, Slepchenko A, Schröder NW, Crother TR, Bulut Y, Doherty TM, Bradley M, Shaposhnik Z, Peterson EM, Tontoz P, Shah PK, Arditi M. TLR/MyD88 and liver X receptor alpha signaling pathways reciprocally control *Chlamydia pneumoniae*-induced acceleration of atherosclerosis. *J Immunol.* 2008 Nov 15;181(10):7176-85

Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, Yamamoto A, Yamaguchi H, Kamimoto T, Nara A, Funao J, Nakata M, Tsuda K, Hamada S, Yoshimori T. Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*. *Science* 2004; 306:1037-40

Nakane A, Minagawa T. Induction of alpha and beta interferons during the hyporeactive state of gamma interferon by Mycobacterium bovis BCG cell wall fraction in Mycobacterium bovis BCG-sensitized mice. *Infect Immun.* 1982 Jun;36(3):966-70.

Nathan, C. & Shiloh, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2000 97, 8841–8848

Nguyen KB, Salazar-Mather TP, Dalod MY, Van Deusen JB, Wei XQ, Liew FY, Caligiuri MA, Durbin JE, Biron CA. Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J Immunol.* 2002 Oct 15;169(8):4279-87.

Njau F, Geffers R, Thalmann J, Haller H, Wagner AD. Restriction of *Chlamydia pneumoniae* replication in human dendritic cell by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Microbes Infect.* 2009 Nov;11(13):1002-10.

Netea, M. G., B. J. Kullberg, L. E. Jacobs, T. J. Verver-Jansen, J. van der Ven-Jongekrijg, J. M. Galama, A. F. Stalenhoef, C. A. Dinarello, and J. W. Van der Meer.. *Chlamydia pneumoniae* stimulates IFN-gamma synthesis through MyD88-dependent, TLR2- and TLR4-independent induction of IL-18 release. *J Immunol* 2004 173:1477-82.

Niesel DW, Hess CB, Cho YJ, Klimpel KD, Klimpel GR. Natural and recombinant interferons inhibit epithelial cell invasion by *Shigella* spp. *Infect Immun.* 1986 Jun;52(3):828-33.

O'Connell,R.M., Saha,S.K., Vaidya,S.A., Bruhn,K.W., Miranda,G.A., Zarnegar,B., Perry,A.K., Nguyen,B.O., Lane,T.F., Taniguchi,T., Miller,J.F., and Cheng,G. Type I interferon production enhances susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *J. Exp. Med.* 2004 200, 437-445.

O'Connell CM, Ionova IA, Quayle AJ, Visintin A, Ingalls RR (2006) Localization of TLR2 and MyD88 to *Chlamydia trachomatis* inclusions. Evidence for signaling by intracellular TLR2 during infection with an obligate intracellular pathogen. *J Biol Chem* 281: 1652–1659.

Ogawa, M., Yoshimori, T., Suzuki, T., Sagara, H., Mizushima, N., and Sasakawa, C. Escape of intracellular *Shigella* from autophagy. *Science* 2005 307: 727–731.

Ogura Y, Inohara N, Chen FF, Muto A, Nunez G Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem.* 2001 276, 2551-2554.

Opitz B, Vinzing M, van Laak V, Schmeck B, Heine G, Günther S, Preissner R, Slevogt H, N'Guessan PD, Eitel J, Goldmann T, Flieger A, Suttorp N, Hippenstiel S. *Legionella pneumophila* induces IFN β in lung epithelial cells via IPS-1 and IRF3, which also control bacterial replication. *J Biol Chem.* 2006 Nov 24;281(47):36173-9.

Opitz B, Püschel A, Beermann W, Hocke AC, Förster S, Schmeck B, Van Laak V, Chakraborty T, Suttorp N, Hippenstiel S. *Listeria monocytogenes* activated p38 MAPK and Induced IL-8 Secretion in a Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 1-Dependent Manner in Endothelial Cells1. *The Journal of Immunology* 2006 176, 484–490.

Orvedahl A, Levine B. Eating the enemy within: autophagy in infectious diseases. *Cell Death Differ* 2009; 16:57-69

Ouburg S, Lyons JM, Land JA, den Hartog JE, Fennema JS, de Vries HJ, Bruggeman CA, Ito JI, Peña AS, Lundberg PS, Morré SA. TLR9 KO mice, haplotypes and CPG indices in *Chlamydia trachomatis* infection. *Drugs Today (Barc).* 2009 Nov;45

Ouellette SP, Dorsey FC, Moshiah S, Cleveland JL, Carabeo RA. *Chlamydia* species-dependent differences in the growth requirement for lysosomes. *PLoS One.* 2011 Mar 8;6(3):e16783.

Panne D, Maniatis T, Harrison SC. Crystal structure of ATF-2/c-Jun and IRF3 bound to the interferon-beta enhancer. *EMBO J.* 2004 Nov 10;23(22):4384-93.

Pandey AK, Yang Y, Jiang Z, Fortune SM, Coulombe F, Behr MA, Fitzgerald KA, Sasseti CM, Kelliher MA. NOD2, RIP2 and IRF5 play a critical role in the type I interferon response to *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog. 2009 Jul;5(7):e1000500.

Paolillo R, Iovene MR, Romano Carratelli C, Rizzo A. Induction of VEGF and MMP-9 expression by toll-like receptor 2/4 in human endothelial cells infected with *Chlamydia pneumoniae*. Int J Immunopathol Pharmacol. 2012 Apr-Jun;25(2):377-86.

Park HS, Chun JN, Jung HY, Choi C, Bae YS. Role of NADPH oxidase 4 in lipopolysaccharide-induced proinflammatory responses by human aortic endothelial cells. Cardiovasc Res. 2006 Dec 1;72(3):447-

Parvatiyar K, Zhang Z, Teles RM, Ouyang S, Jiang Y, Iyer SS, Zaver SA, Schenk M, Zeng S, Zhong W, Liu ZJ, Modlin RL, Liu YJ, Cheng G. The helicase DDX41 recognizes the bacterial secondary messengers cyclic di-GMP and cyclic di-AMP to activate a type I interferon immune response. Nat Immunol. 2012 Dec;13(12):1155-61.

Passwell JH, Shor R, Shoham J. The enhancing effect of interferon-beta and -gamma on the killing of *Leishmania tropica major* in human mononuclear phagocytes in vitro. J Immunol. 1986 Apr 15;136(8):3062-6.

Perez-Vizcaino F, Cogolludo A, Moreno L. Reactive oxygen species signaling in pulmonary vascular smooth muscle. Respir Physiol Neurobiol 2010 December 31;174(3):212-20.

Pestka, S., Krause, C. D. & Walter, M. R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. Immunol. Rev. 2004 202, 8–32

Peters J, Wilson DP, Myers G, Timms P, Bavoil PM Type III secretion a la *Chlamydia*. Trends Microbiol 2007 15: 241–251

Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, Weber F, Reis e Sousa C RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. Science 2006 314, 997-1001

Pollpeter D, Komuro A, Barber GN, Horvath CM (2011) Impaired Cellular Responses to Cytosolic DNA or Infection with *Listeria monocytogenes* and Vaccinia Virus in the Absence of the Murine LGP2 Protein. PLoS One 6:e18842

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in Tlr4 gene. Science 1998 282, 2085.

Prantner D, Nagarajan UM Role for the chlamydial type III secretion apparatus in host cytokine expression. Infect Immun 2009 77: 76–84.

Prantner D, Darville T, Nagarajan UM. Stimulator of IFN gene is critical for induction of IFN-beta during *Chlamydia muridarum* infection. J Immunol. 2010 Mar 1;184(5):2551-60.

- Prantner D, Sikes JD, Hennings L, Savenka AV, Basnakian AG, Nagarajan UM. Interferon regulatory transcription factor 3 protects mice from uterine horn pathology during *Chlamydia muridarum* genital infection. *Infect Immun*. 2011 Oct; 79 (10)
- Prebeck S, Brade H, Kirschning CJ, da Costa CP, Dürr S, Wagner H, Miethke T. The Gram-negative bacterium *Chlamydia trachomatis* L2 stimulates tumor necrosis factor secretion by innate immune cells independently of its endotoxin. *Microbes Infect*. 2003 May; 5(6):463-70.
- Pugsley, A. P., d'Enfert, C., Reyss, I. & Kornacker, M. G. Genetics of extracellular protein secretion by Gram-negative bacteria. *Annu Rev Genet* 1990 24, 67–90.
- Pugsley, A. P., Francetic, O., Driessen, A. J. & de Lorenzo, V. Getting out: protein traffic in prokaryotes. *Mol Microbiol* 2004 52, 3–11
- Qureshi, S. T., Lariviere, L., Leveque, G., Clermont, S., Moore, K. J., Gros, P., and Malo, D. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J. Exp. Med*. 1999 189, 615
- Ramirez JA. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from the coronary artery of a patient with coronary atherosclerosis. *Ann Intern Med* 1996 125, 979-982.
- Rathinam, Z. Jiang, et al., The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses, *Nat. Immunol*. 2010 11 (5) 395–402.
- Rathinam VA, Vanaja SK, Waggoner L, Sokolovska A, Becker C, Stuart LM, Leong JM, Fitzgerald KA. TRIF licenses caspase-11-dependent NLRP3 inflammasome activation by gram-negative bacteria. *Cell*. 2012 Aug 3;150(3):606-19.
- Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2010;90:1383-1435
- Rebsamen M, Vazquez J, Tardivel A, Guarda G, Curran J, Tschopp NLRX1/NOD5 deficiency does not affect MAVS signalling. *J. Cell Death Differ*. 2011 Aug;18 (8):1387.
- Rich KA, Burkett C, Webster P. Cytoplasmic bacteria can be targets for autophagy. *Cell Microbiol*. 2003 Jul;5(7):455-68.
- Rivera J, Walduck AK, Strugnell RA, Sobey CG, Drummond GR. *Chlamydia pneumoniae* induces a pro-inflammatory phenotype in murine vascular smooth muscle cells independently of elevating reactive oxygen species. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012 Mar; 39(3):218-26.
- Rock, K. L. & Kono, H. The inflammatory response to cell death. *Annu. Rev. Pathol*. 2008 3, 99–126
- Rockey DD, Heinzen RA, Hackstadt T. Cloning and characterization of a *Chlamydia psittaci* gene coding for a protein localized in the inclusion membrane of infected cells. *Mol Microbiol*. 1995 Feb;15(4):617-26

Rockey, D. D., Fischer, E. R. & Hackstadt, T. Temporal analysis of the developing *Chlamydia psittaci* inclusion by use of fluorescence and electron microscopy. *Infect Immun* 1996 64, 4269–4278

Rockey, D. D., Scidmore, M. A., Bannantine, J. P. & Brown, W. J. Proteins in the chlamydial inclusion membrane. *Microbes Infect* 2002 4, 333–340.

Rodriguez N, Wantia N, Fend F, Du'rr S, Wagner H, et al. Differential involvement of TLR2 and TLR4 in host survival during pulmonary infection with *Chlamydia pneumoniae*. *Eur J Immunol* 2006 36: 1145–1155.

Rödel J, Grosse C, Yu H, Wolf K, Otto GP, Liebler-Tenorio E, Forsbach-Birk V, Straube E. Persistent *Chlamydia trachomatis* infection of HeLa cells mediates apoptosis resistance through a *Chlamydia* protease-like activity factor-independent mechanism and induces high mobility group box 1 release. *Infect Immun*. 2012 Jan;80(1):195-205.

Rogge L, Barberis-Maino L, Biffi M, Passini N, Presky DH, Gubler U, Sinigaglia F. Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J Exp Med*. 1997 Mar 3; 185(5):825-31.

Rollag H, Degré M, Sonnenfeld G. Effects of interferon-alpha/beta and interferon-gamma preparations on phagocytosis by mouse peritoneal macrophages. *Scand J Immunol*. 1984 Aug;20(2):149-55.

Rosenberger CM, Gallo RL, Finlay BB. Interplay between antibacterial effectors: a macrophage antimicrobial peptide impairs intracellular *Salmonella* replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Feb 24;101(8):2422-7.

Rosenfeld, ME und L.A. Campbell, Pathogens and atherosclerosis: update on the potential contribution of multiple infectious organisms to the pathogenesis of atherosclerosis, *Thromb. Haemost*. 2011 106 858e867.

Rothermel CD, Byrne GI, Havell EA. Effect of interferon on the growth of *Chlamydia trachomatis* in mouse fibroblasts (L cells). *Infect Immun*. 1983 Jan;39(1):362-70.

Rothfuchs AG, Trumstedt C, Mattei F, Schiavoni G, Hidmark A, Wigzell H, Rottenberg ME. STAT1 regulates IFN-alpha beta- and IFN-gamma-dependent control of infection with *Chlamydia pneumoniae* by nonhemopoietic cells. *J Immunol*. 2006 Jun 1;176(11):6982-90.

Rothfuchs, C. Trumstedt, H. Wigzell, M.E. Rottenberg, Intracellular bacterial infection-induced IFN-gamma is critically but not solely dependent on Toll-like receptor 4-myeloid differentiation factor 88-IFNalpha beta-STAT1 signaling, *J. Immunol*. 2004 172

Roux, C. M., H. G. Rola'n, R. L. Santos, P. D. Beremand, T. L. Thomas, L. G. Adams, and R. M. Tsolis. *Brucella* requires a functional Type IV secretion system to elicit innate immune responses in mice. *Cell. Microbiol*. 2007 9: 1851–1869.

Rusten TE, Stenmark H. p62, an autophagy hero or culprit? *Nat Cell Biol*. 2010 Mar;12(3):207-9.

Sabbah A, Chang TH, Harnack R, Frohlich V, Tominaga K, Dube PH, Xiang Y, Bose S. Activation of innate immune antiviral responses by Nod2. *Nat Immunol.* 2009; 10:1073–1080.

Sadler, A. & Williams, B. R. G. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nature Rev. Immunol.* 2008 8, 559–568

Saikku P, Leinonen M, Mattila K, Ekman MR, Nieminen MS, Mäkelä PH, Huttunen JK, Valtonen V: Serological evidence of an association of a novel *Chlamydia*, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet* 1988 2, 983 - 986

Saitoh T, Hirai R, Loo YM, Owen D, Johnson CL, Sinha SC, Akira S, Fujita T, Gale M Jr. Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104:582–587.

Saitoh T, Fujita N, Hayashi T, Takahara K, Satoh T, Lee H, Matsunaga K, Kageyama S, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Kawai T, Ishii K, Takeuchi O, Yoshimori T, Akira S. Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009 106:20842–20846.

Saka HA, Thompson JW, Chen YS, Kumar Y, Dubois LG, Moseley MA, Valdivia RH. Quantitative proteomics reveals metabolic and pathogenic properties of *Chlamydia trachomatis* developmental forms. *Mol. Microbiol.* 2011 82:1185–1203.

Sandanger O, Ranheim T, Vinge LE, Bliksøen M, Alfsnes K, Finsen AV, Dahl CP, Askevold ET, Florholmen G, Christensen G, Fitzgerald KA, Lien E, Valen G, Espevik T, Aukrust P, Yndestad A. The NLRP3 inflammasome is up-regulated in cardiac fibroblasts and mediates myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2013 Jul 1;99(1):164-174.

Sasu S, LaVerda D, Qureshi N, Golenbock DT, Beasley D *Chlamydia pneumoniae* and chlamydial heat shock protein 60 stimulate proliferation of human vascular smooth muscle cells via toll-like receptor 4 and p44/p42 mitogen-activated protein kinase activation. *Circ Res* 2001 89: 244–250.

Sato M, Hata N, Asagiri M, Nakaya T, Taniguchi T, Tanaka N. Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *FEBS Lett.* 1998 Dec 11;441(1):106-10.

Sato M, et al. Distinct and essential roles of transcription factors IRF3 and IRF7 in response to viruses for IFN- α /beta gene induction. *Immunity* 2000;13:539–548

Satoh T, Kato H, Kumagai Y, Yoneyama M, Sato S, Matsushita K, Tsujimura T, Fujita T, Akira S, Takeuchi O. "LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010 107 (4): 1512–7.

Scherz-Shouval R, Elazar Z. Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends Biochem Sci* 2011; 36:30-8

Schenten und Medzhitov The control of adaptive immune responses by the innate immune system. *Advances in Immunology* 2011 Volume 109, 87-124

Schiavoni G, Mauri C, Carlei D, Belardelli F, Pastoris MC, et al. Type I IFN protects permissive macrophages from *Legionella pneumophila* infection through an IFN-gamma-independent pathway. J Immunol 2004 173: 1266–1275.

Schmeck B, Beermann W, Dje NGuessan P, Hocke AC, Opitz B, Eitel J, Dinh QT, Witzentrath M, Kruhl M, Suttorp N, Hippenstiel S. Simvastatin reduces *Chlamydomonas pneumoniae*-mediated histone modifications and gene expression in cultured human endothelial cells. Circ Res. 2008;102: 888–895.

Schoggins, J. W. et al. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. Nature 2011 472, 481–485

Schmitz JL, Carlin JM, Borden EC, Byrne GI. Beta interferon inhibits *Toxoplasma gondii* growth in human monocyte-derived macrophages. Infect Immun. 1989 Oct;57(10):3254-6.

Schroder K, Zhou R, Tschopp J. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? Science. 2010 Jan 15;327(5963):296-300.

Schwarzenbacher, R und Pröll M; NLR-die neue Klasse von Immunrezeptoren; clinicum, 2008 Juni-Ausgabe

Schwartz KT, Carleton JD, Quillin SJ, Rollins SD, Portnoy DA, Leber JH. Hyperinduction of host beta interferon by a *Listeria monocytogenes* strain naturally overexpressing the multidrug efflux pump MdrT. Infect. Immun. 2012 80:1537–1545.

Scidmore, M. A., E. R. Fischer, and T. Hackstadt. Restricted fusion of *Chlamydia trachomatis* vesicles with endocytic compartments during the initial stages of infection. Infect. Immun. 2003 71:973–984.

Segal AW. The NADPH oxidase and chronic granulomatous disease. Mol Med Today 1996; 2(3):129–135.

Seibenhener, M. L., T. Geetha, and M. W. Wooten. Sequestosome 1/p62: more than just a scaffold. FEBS Lett. 2007 581: 175–179.

Seong SY, Matzinger P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. Nat Rev Immunol. 2004 Jun;4(6):469-78

Shahnazari S, Brumell JH. Mechanisms and consequences of bacterial targeting by the autophagy pathway. Curr Opin Microbiol 2011;14:68-75

Shaw, E. I., Dooley, C. A., Fischer, E. R., Scidmore, M. A., Fields, K. A. & Hackstadt, T. Three temporal classes of gene expression during the *Chlamydia trachomatis* developmental cycle. Mol Microbiol 2000 37, 913–925

Shi Y and Tokunaga O *Chlamydia pneumoniae* and multiple infections in the aorta contribute to atherosclerosis. Pathol Int. 2002 52, 755-763.

Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. Proc Natl Acad Sci USA 1994 91:10771–10778

Shimada K, Chen S, Dempsey PW, Sorrentino R, Alsabeh R, et al The NOD/RIP2 pathway is essential for host defenses against *Chlamydomydia pneumoniae* lung infection. PLoS Pathog 2009 5: e1000379.

Shimada K, T.R. Crother, J. Karlin, S. Chen, N. Chiba, V.K. Ramanujan, L. Vergnes, D.M. Ojcius, M. Arditi, Caspase-1 dependent IL-1b secretion is critical for host defense in a mouse model of *Chlamydia pneumoniae* lung infection, PLoS One 6 (2011) e21477.

Shuvaev, J. Han, K.J. Yu, S. Huang, B.J. Hawkins, M. Madesh, M. Nakada, V.R. Muzykantov, PECAM-targeted delivery of SOD inhibits endothelial inflammatory response, FASEB J. 25 2011 348–357.

Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. Apoptosis. 2000 Nov;5(5):415-8. Review.

Stanley SA, Johndrow JE, Manzanillo P, Cox JS. The Type I IFN response to infection with Mycobacterium tuberculosis requires ESX-1-mediated secretion and contributes to pathogenesis. J Immunol. 2007 Mar 1;178(5):3143-52.

Stetson DB, Medzhitov R. Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immuneresponse. Immunity 2006; 24:93–103.

Soares F, Tattoli I, Wortzman ME, Arnoult D, Philpott DJ, Girardin SE. NLRX1 does not inhibit MAVS-dependent antiviral signalling. Innate Immun. 2012 Dec 4.

Stephens RS. Chlamydia: Intracellular Biology, Pathogenesis, and Immunity. American Society for Microbiology, 1999.

Stockinger, S., T. Decker. Novel functions of type I interferons revealed by infection studies with Listeria monocytogenes. Immunobiology 2008 213:889–897.

Suchland, R.J. et al. Development of secondary inclusions in cells infected by *Chlamydia trachomatis*. Infect. Immun. 2005 73, 3954–3962

Summersgill JT, Molestina RE, Miller RD, Ramirez JA. Interactions of *Chlamydia pneumoniae* with human endothelial cells. J Infect Dis. 2000; 181:S479–S482.

Sumpter R Jr, Levine B. Autophagy and innate immunity: triggering, targeting and tuning. Semin Cell Dev Biol 2010; 21:699-711

Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. Science. 2013 Feb 15;339(6121):786-91.

Suzuki, N., Suzuki, S., Duncan, G. S., Millar, D. G., Wada, T., Mirtsos, C., Takada, H., Wakeham, A., Itie, A., Li, S., Penninger, J. M., Wesche, H., et al. Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. Nature 2002 416, 750.

Swanetek, J. L., Tsen, M. F., Cobb, M. H., and Thomas, J. A. IL-1 receptor-associated kinase modulates host responsiveness to endotoxin. J. Immunol. 2000 164, 4301.

- Takahashi K, Kawai T, Kumar H, Sato S, Yonehara S, Akira S. Roles of caspase-8 and caspase-10 in innate immune responses to double-stranded RNA. *J Immunol* 2006;176:4520–4524
- Takaoka A, Wang Z, Choi MK, et al. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 2007; 448:501–505.
- Takeuchi and Akira; Pattern Recognition Receptors and Inflammation; Cell Volume 140, Issue 6, 19 March 2010, Pages 805–820
- Tal MC, Iwasaki A. Autophagy and innate recognition systems. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009; 335:107-21.
- Tamayo R, Pratt JT, Camilli A. Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annu Rev Microbiol*. 2007;61:131-48. Review.
- Tanaka N, Sato M, Lamphier MS, Nozawa H, Oda E, Noguchi S, Schreiber RD, Tsujimoto Y, Taniguchi T. Type I interferons are essential mediators of apoptotic death in virally infected cells. *Genes Cells*. 1998 Jan;3(1):29-37.
- Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A and Tanaka N IRF Family of transcription factors as regulators of host defense *Annu. Rev. Immunol*. 2001 19, 623–55
- Thanos, D., and T. Maniatis. 1995. Virus induction of human IFN gene expression requires the assembly of an enhanceosome. *Cell* 83: 1091–1100.
- Taraska, T., Ward, D. M., Ajioka, R. S., Wyrick, P. B., Davis-Kaplan, S. R., Davis, C. H. & Kaplan, J. The late chlamydial inclusion membrane is not derived from the endocytic pathway and is relatively deficient in host proteins. *Infect Immun* 1996 64, 3713–3727.
- Tattoli I, Carneiro LA, Jéhanho M, Magalhaes JG, Shu Y, Philpott DJ, Arnoult D, Girardin SE. NLRX1 is a mitochondrial NOD-like receptor that amplifies NF-kappaB and JNK pathways by inducing reactive oxygen species production. *EMBO Rep*. 2008 Mar;9(3):293-300.
- Taylor, G.A., Feng, C.G., and Sher, A. p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nat. Rev. Immunol*. 2004 4, 100-109.
- Thomas SR, Witting PK, Drummond GR. Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Oct;10(10):1713-65.
- J.P. Ting, R.C. Lovering, E.S. Alnemri, J. Bertin, J.M. Boss, B.K. Davis, R.A. Flavell, S.E. Girardin, A. Godzik, J.A. Harton et al. The NLR gene family: a standard nomenclature *Immunity*, 2008 28 pp. 285–287
- Tontonoz, P.K. Shah, M. Arditi, TLR/MyD88 and liver X receptor alpha signaling pathways reciprocally control *Chlamydia pneumoniae* induced acceleration of atherosclerosis, *J. Immunol*. 2008 181 7176e7185.
- Torzewski M und Lackner KJ Initiation and progression of atherosclerosis-enzymatic or oxidative modification of low density lipoprotein? *Clin Chem Lab med*. 2006 44, 1389-1394

Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol* 2004 October;122(4):339-52.

Trumstedt, C., E. Eriksson, A.M. Lundberg, T. B. Yang, Z.Q. Yan, H. Wigzell, and M. E. Rottenberg. Role of IRAK4 and IRF3 in the control of intracellular infection with *Chlamydia pneumoniae*. *J. Leukoc. Biol.* 2007 81: 1591–1598.

Tsutsui M. Neuronal nitric oxide synthase as a novel anti-atherogenic factor. *J Atheroscler Thromb* 2004;11(2):41-8.

Tsutsumi-Ishii, Y., K. Shimada, H. Daida, R. Toman, and I. Nagaoka. Low potency of *Chlamydia* LPS to activate human mononuclear cells due to its reduced affinities for CD14 and LPS-binding protein. *Int Immunol* 2008 20:199- 208.

Unterholzner L, Keating SE, Baran M, Horan KA, Jensen SB, Sharma S, Sirois CM, Jin T, Latz E, Xiao TS, Fitzgerald KA, Paludan SR, Bowie AG. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat Immunol.* 2010 Nov;11(11):997-1004.

Utaisincharoen P, Anuntagool N, Arjcharoen S, Limposuwan K, Chaisuriya P, Sirisinha S. Induction of iNOS expression and antimicrobial activity by interferon (IFN)-beta is distinct from IFN-gamma in *Burkholderia pseudomallei*-infected mouse macrophages. *Clin Exp Immunol.* 2004 May;136(2):277-83.

van Ooij, C., Apodaca, G. & Engel, J. Characterization of the *Chlamydia trachomatis* vacuole and its interaction with the host endocytic pathway in HeLa cells. *Infect Immun* 1997 65, 758–766.

van Wetering S, van den Berk N, van Buul JD, Mul FP, Lommerse I, Mous R, ten Klooster JP, Zwaginga JJ, and Hordijk PL. VCAM-1-mediated Rac signaling controls endothelial cell–cell contacts and leukocyte transmigration. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003 285: C343–C352,

Veals SA, Schindler C, Leonard D, Fu XY, Aebersold R, Darnell JE Jr, Levy DE. Subunit of an alpha-interferon-responsive transcription factor is related to interferon regulatory factor and Myb families of DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol.* 1992 Aug;12(8):3315-24.

Vignola MJ, Kashatus DF, Taylor GA, Counter CM, Valdivia RH. cPLA2 regulates the expression of type I interferons and intracellular immunity to *Chlamydia trachomatis*. *J Biol Chem.* 2010 Jul 9;285(28):21625-35.

von Lohneysen, K. , Noack, D. , Jesaitis, A. J. , Dinanuer, M. C. & Knaus, U. G. Mutational analysis reveals distinct features of the Nox4-p22 phox complex. *J. Biol. Chem.* 2008 283, 35273–35282

Wang P, Arjona A, Zhang Y, Sultana H, Dai J, Yang L, LeBlanc PM, Doiron K, Saleh M, Fikrig E. Caspase-12 controls West Nile virus infection via the viral RNA receptor RIG-I. *Nat Immunol.* 2010; 11:912–919.

Wantia N, Rodriguez N, Ciril C, Ertl T, Dürr S, Layland LE, Wagner H, Miethke T. Toll-like receptors 2 and 4 regulate the frequency of IFN γ -producing CD4⁺ T-cells during pulmonary infection with *Chlamydia pneumoniae*. *PLoS One.* 2011; 6(11):e26101.

- Watanabe T., Asano N., Fichtner-Feigl S., Gorelick P.L., Tsuji Y., Matsumoto Y., Chiba T., Fuss I.J., Kitani A., Strober W. NOD1 contributes to mouse host defense against *Helicobacter pylori* via induction of type I IFN and activation of the ISGF3 signaling pathway. *J. Clin. Invest.* 2010 120:1645–1662.
- Wathelet MG, Lin CH, Parekh BS, Ronco LV, Howley PM and Maniatis T Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN β enhancer in vivo. *Mol. Cell.* 1998 1, 507-518.
- Watson C, Alp NJ. Role of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerosis. *Clin Sci (Lond).* 2008 Apr;114(8):509-31.
- Welter-Stahl, L. et al. Stimulation of the cytosolic receptor for peptidoglycan, Nod1, by infection with *Chlamydia trachomatis* or *Chlamydia muridarum*. *Cell. Microbiol.* 2006 8, 1047–1057
- Werts C, le Bourhis L, Liu J, Magalhaes JG, Carneiro LA, Fritz JH, Stockinger S, Balloy V, Chignard M, Decker T, Philpott DJ, Ma X, Girardin SE. Nod1 and Nod2 induce CCL5/RANTES through the NF-kappaB pathway. *Eur J Immunol.* 2007 Sep;37(9):2499-508.
- Wesche, H., Henzel, W. J., Shillinglaw, W., Li, S., and Cao, Z. MyD88: An adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 1997 7, 837.
- Wolf, K., E. Fischer, and T. Hackstadt. Degradation of *Chlamydia pneumoniae* by peripheral blood monocytic cells. *Infect. Immun.* 2005 73:4560–4570.
- Woodward, J. J., Iavarone, A. T. & Portnoy, D. A. c-di-AMP secreted by intracellular *Listeria monocytogenes* activates a host type I interferon response. *Science* 2010 328, 1703–1705
- Wu J, Sun L, Chen X, Du F, Shi H, Chen C, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science.* 2013 Feb 15;339(6121):826-30.
- Wylie, J. L., Hatch, G. M. & McClarty, G Host cell phospholipids are trafficked to and then modified by *Chlamydia trachomatis*. *J Bacteriol* 1997 179, 7233–7242
- Wyrick, P. B. (2000). Intracellular survival by *Chlamydia*. *Cell Microbiol* 2000 2, 275–282
- Xia X, Cui J, Wang HY, Zhu L, Matsueda S, Wang Q, Yang X, Hong J, Songyang Z, Chen ZJ, Wang RF. NLRX1 negatively regulates TLR-induced NF- κ B signaling by targeting TRAF6 and IKK. *Immunity.* 2011 Jun 24;34(6):843-53.
- Xiao TS, Ting JP. NLRX1 has a tail to tell. *Immunity.* 2012 Mar 23;36(3):311-2.
- Xu LG, Wang YY, Han KJ, Li LY, Zhai Z, Shu HB. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN β -signaling. *Mol Cell.* 2005 Sep 16;19(6):727-40.

Yang P, An H, Liu X, Wen M, Zheng Y, Rui Y, Cao X. The cytosolic nucleic acid sensor LRRFIP1 mediates the production of type I interferon via a beta-catenin-dependent pathway. *Nat Immunol.* 2010 Jun;11(6):487-94.

Yang Y, Bazhin AV, Werner J, Karakhanova S. Reactive Oxygen Species in the Immune System. Department of General Surgery, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany. *Int Rev Immunol.* 2013 Apr 25

Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., and Akira, S. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003 301, 640.

Yamasaki K, Muto J, Taylor KR, Cogen AL, Audish D, Bertin J, Grant EP, Coyle AJ, Misaghi A, Hoffman HM, Gallo RL. 2009. NLRP3/cryopyrin is necessary for interleukin-1beta (IL-1beta) release in response to hyaluronan, an endogenous trigger of inflammation in response to injury. *J Biol Chem* 2009 284: 12762-

Yeh LH, Park YJ, Hansalia RJ, Ahmed IS, Deshpande SS, Goldschmidt-Clermont PJ, Irani K, and Alevriadou BR. Shear-induced tyrosine phosphorylation in endothelial cells requires Rac1-dependent production of ROS. *Am J Physiol* 1999 276: C838–C847,

Yoneyama M, Suhara W, Fukuhara Y, Fukuda M, Nishida E, Fujita T Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF3 and CBP/p300. *EMBO J.* 1998 17, 1087–95

Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol.* 2004 Jul;5(7):730-7. Epub 2004 Jun 20.

Yong, E. C., E. Y. Chi, and C. C. Kuo. Differential antimicrobial activity of human mononuclear phagocytes against the human biovars of *Chlamydia trachomatis*. *J. Immunol.* 1987 139:1297–1302.

Yoshikawa, Y., Ogawa, M., Hain, T., Yoshida, M., Fukumatsu, M., Kim, M., et al. *Listeria monocytogenes* Act A mediated escape from autophagic recognition. *Nat Cell Biol* 2009 11: 1233–1240.

Zhang, J. P., and R. S. Stephens. Mechanism of *C. trachomatis* attachment to eukaryotic host cells. *Cell* 1992 69:861-869.

Zhang L, Pagano JS IRF7, a new interferon regulatory factor associated with Epstein-Barr virus latency. *Mol Cell Biol.* 1997 17, 5748-5757

Zhang Y, Wang H, Ren J, Tang X, Jing Y, Xing D, Zhao G, Yao Z, Yang X, Bai H. IL-17A synergizes with IFN- γ to upregulate iNOS and NO production and inhibit chlamydial growth. *PLoS One.* 2012; 7(6):e39214

Zheng YT, Shahnazari S, Brech A, Lamark T, Johansen T, Brumell JH. The adaptor protein p62/SQSTM1 targets invading bacteria to the autophagy pathway. *J Immunol.* 2009 Nov 1;183(9):5909-16.

Zhong B, Yang Y, Li S, Wang YY, Li Y, Diao F, Lei C, He X, Zhang L, Tien P, Shu HB. The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity*. 2008 Oct 17;29(4):538-50.

Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol* 2010 11: 136-4

Zimmer S, Steinmetz M, Asdonk T, Motz I, Coch C, Hartmann E, Barchet W, Wassmann S, Hartmann G, Nickenig G. Activation of endothelial toll-like receptor 3 impairs endothelial function. *Circ Res*. 2011 May 27;108(11):1358-66.

9. Appendix

9.1. Curriculum vitae

Aufgrund des Datenschutzes enthält dieses Dokument in der Onlineversion keinen Lebenslauf.

9.2. Kongressbeiträge

- | | |
|----------------|--|
| April 2012 | 10. Deutscher Chlamydien Workshop, Erfurt Posterbeitrag: "Rac1 Regulates the NLRP3 Inflammasome which Mediates IL-1 β Production in <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> Infected Human Mononuclear Cells". |
| Februar 2010 | 9. Deutscher Chlamydien Workshop, Herrsching
Posterbeiträge: „Essential role of MAVS, IRF3 and IRF7 in <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> –mediated IFN β response and control of bacterial replication in human endothelial cells”,
“A NLRP3 inflammasome as well as Rac1 mediate IL-1 β production in <i>C. pneumoniae</i> -infected human monocytes”. |
| September 2009 | Besuch des 2nd European congress of Immunology, ECI Berlin ICC . |
| März 2009 | 8. Deutscher Chlamydien Workshop, Lübeck
Vortragsbeitrag: „Role of IFN β in <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> infection of endothelial cells“. |
| September 2008 | Toll 2008 Meeting, Lisbon Portugal, Recent Advances in Pattern Recognition, Posterbeitrag: “ <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> -mediated induction of IFN β in endothelial cells and the impact on the bacterial replication”. |
| März 2007 | Young Investigator Symposium on Infection Biology Würzburg, Posterbeitrag: “ <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> - |

mediated induction of IFN β in endothelial cells and the impact on the bacterial replication”.

9.3. Publikationen

- März 2010 Claudia Buß, Bastian Opitz, Andreas C. Hocke, Juliane Lippmann, Vincent van Laak, Stefan Hippenstiel, Matthias Krüll, Norbert Suttorp and Julia Eitel; **“Essential Role of Mitochondrial Antiviral Signaling, IFN Regulatory Factor IRF3, and IRF7 in *Chlamydomphila pneumoniae*-Mediated IFN- β Response and Control of Bacterial Replication in Human Endothelial Cells”**. The Journal of Immunology: March 15, 2010 vol. 184 no. 6 3072-307
- Januar 2012 Julia Eitel*, Karolin Meixenberger*, Claudia van Laak*, Christine Orlovski, Andreas Hocke, Bernd Schmeck, Stefan Hippenstiel, Philippe Dje N’Guessan, Norbert Suttorp and Bastian Opitz; PLoS One. **“Rac1 Regulates the NLRP3 Inflammasome which Mediates IL-1 β Production in *Chlamydomphila pneumoniae* Infected Human Mononuclear Cells”**; PLoS One. 2012; 7(1) Epub 2012 Jan 20.
*These authors contributed equally.
- In Bearbeitung Claudia van Laak, Andreas Hocke, Leif. E. Sander, Ute Gläser, George Trendelenburg, Vincent van Laak, Norbert Suttorp and Bastian Opitz; **“NLRX1 mediates cell-autonomous resistance against *C. pneumoniae* in human endothelial cells and murine macrophages”**

9.4. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich versichere, dass diese Arbeit in dieser oder anderer Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde. Der Inhalt der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin vom 27.06.2012 ist mir bekannt.

Berlin, den 15.10.2013